台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.69 No.1 2020

Research Articles

1 Evaluation of the Effects of Spraying Cucumber Seedlings with Salicylic Acid Mixed Solution (SMC Solution) on Cotton Aphids (*Aphis gossypii* Glover)
Yaw-Jen Dong and Bei-Chen Hsiu

11 Physiological Characteristics, Pathogenicity and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum siamense* Causing Lychee Pepper Spot Disease
Chao-Jung Wu, Chiao-Wen Huang, Jer-Way Chang, and Hui-Fang Ni

25 Rice Lodging Detection Using the Photography from Unmanned Aerial Vehicle (UAV)
Chiao-Ying Chou, Shi-Yang Wu, and Chi-Ling Chen

46 Molecular Characterization of the *Telosma mosaic virus* Passionfruit Isolates and the Development and Application of Its Wide-Spectrum Molecular Detection Techniques
Wen-Li Lee, Chinnapan Thanarut, Chih-Cheng Hsu, Guo-Chi Lee, Fen-Lang Chiang, and Chin-Chih Chen

65 Pseudobulb Rot of *Cymbidium* Caused by *Fusarium oxysporum*
Chiao-Wen Huang, Jin-Hsing Huang, Yi-Ching Li, Chun-Wei Chen, and Ting-Fang Hsieh

77 Identification and Detection of *Plumeria mosaic virus* Infecting Desert Rose (*Adenium obesum*)
Yi-Ting Lin, Chin-Hui Tsai, Mei-Ju Lin, and Ting-Chin Deng

90 Quality Analysis of Commercial Phosphate-Solubilizing Bio-Fertilizer Products
Su-Chen Lin, Zi-Jun Lin, and Shiuan-Yuh Chien

101 Assessment Study on Indigenous Farmers Training Needs at Guangfu Township in Hualien County
Cin-Sian Tang Yang and Shu-Chun Chang

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.69 No.1 2020

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.1 2020

研究報告

1 評估施用水楊酸混合液 (SMC溶液) 於小黃瓜植株對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響
董耀仁、許北辰

11 *Colletotrichum siamens* 引起之荔枝葉部針點病病原特性及防治藥劑篩選
吳昭蓉、黃巧雯、張哲瑋、倪蕙芳

25 無人飛行載具之航拍影像應用於水稻倒伏災損判釋
周巧盈、巫思揚、陳琦玲

46 夜香花嵌紋病毒百香果分離株分子特性及廣效性分子檢測技術之開發應用
李文立、Chinnapan Thanarut、徐智政、李國基、江芬蘭、陳金枝

65 由 *Fusarium oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病
黃巧雯、黃晉興、李怡靜、陳純葳、謝廷芳

77 感染沙漠玫瑰的緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 之鑑定與檢測
林羿廷、蔡錦慧、林玫珠、鄧汀欽

90 市售溶磷菌肥料產品品質分析
林素禎、林姿君、簡宣裕

101 花蓮縣光復鄉原鄉農民訓練需求評估研究
湯楊欽憲、張淑君

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

楊明德／國立中興大學土木工程學系

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十九卷　第一期　　中華民國一〇九年三月三十一日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓／電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號／電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):1–10 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0001

評估施用水楊酸混合液 (SMC 溶液) 於小黃瓜植株對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響

董耀仁[1]　許北辰[1,*]

摘要

董耀仁、許北辰。2020。評估施用水楊酸混合液 (SMC 溶液) 於小黃瓜植株對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響。台灣農業研究 69(1):1–10。

本研究測試小黃瓜植株噴施 0.01% 水楊酸 (salicylic acid)、水楊酸甲酯 (methyl salicylate) 及氯化膽鹼 (choline chloride) 混合溶液 (0.01% SMC)，對小黃瓜植株及棉蚜之影響。結果顯示，噴施處理組之植株呈現顯著較高的株高、葉片數及花數，而分別以噴施、揮發、種子浸泡及澆灌等方法使用 0.01% SMC 處理後，棉蚜數量分別約為對照組的 64.0、67.8、61.3 及 66.1%。其中，噴施 0.01% SMC 處理組，僅需施用 1 次即可使小黃瓜植株產生對棉蚜的防禦效果，且可持效 5 wk。戶外盆栽試驗部分，結果顯示於噴施 0.01% SMC 於「新蜜」、「秀燕」及「阿秀」等小黃瓜植株後，棉蚜的天敵累計數量顯著高於對照組及農藥處理組；而棉蚜數量則分別約為對照組的 67.3、80.1 及 89.7%，但均顯著高於農藥處理組。試驗結果顯示，小黃瓜植株噴施 0.01% SMC 具有促進植株生長及減輕棉蚜危害之效果，具潛力開發做為棉蚜非農藥防治的輔助資材。

關鍵詞：棉蚜、水楊酸、水楊酸甲酯、氯化膽鹼、誘導防禦。

前言

植物無法移動以逃離生長過程中所遭遇多種生物與非生物的壓力，因此植物發展出不同的防禦策略加以因應 (Mithöfer & Boland 2012)。在植物眾多的防禦策略中，目前已知的至少 20 萬種的植物次級代謝物 (secondary metabolites) 分別扮演重要的角色 (Pichersky & Lewinsohn 2011)。植物的次級代謝物中與防禦植食性昆蟲有關者，包括生物鹼 (alkaloids)、萜類化合物 (terpenoids)、氰苷 (cyanogenic glycoside) 及硫代葡萄糖苷 (glucosinolates) 等，其對植食性昆蟲的防禦作用，包括忌避、干擾神經訊號傳導、影響蛋白質酶等消化酵素作用，進而影響營養吸收效率及吸引植食性昆蟲天敵等多種功用 (Mithöfer & Boland 2012)。

在植物防禦反應次級代謝物質的合成中，植物荷爾蒙於其中扮演重要的角色，與植物防禦作用有關的植物荷爾蒙，如茉莉花酸 (jasmonate acid) 及水楊酸 (salicylic acid) 等，其中茉莉花酸一般是針對咀嚼式口器昆蟲誘導產生的防禦反應，而水楊酸則主要針對植物病原及刺吸式口器昆蟲產生反應 (Howe & Jander 2008; Mithöfer & Boland 2012)。前人研究中藉由遺傳、基因組學及生物化學研究結果，顯示植物遭受半翅目 (Hemiptera) 昆蟲取食危害時，所引起的防禦反應與遭受微生物病原入侵時類似 (Kaloshian & Walling 2005; Howe & Jander 2008)。

在植物的誘導防禦反應中，誘發 (priming) 為一種機制，指讓植物處於遭受生物或非生物壓力時，能啟動更快速與有力防禦反應的生理狀態 (Conrath 2009; Mauch-Mani *et al*. 2017)。前人研究顯示，施用可誘發植物水楊

投稿日期：2019 年 1 月 21 日；接受日期：2019 年 4 月 1 日。
[*] 通訊作者：bchen@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市

酸防禦反應的維生素 B1 (Thiamine)，可降低稻麥蚜 (*Rhopalosiphum padi* Linnaeus)、麥長管蚜 (*Sitobion avenae* Fabricius) 及豌豆蚜 (*Acyrthosiphon pisum* Harris) 對大麥 (*Hordeum vulgare* Linnaeus) 及豌豆 (*Pisum sativum* Linnaeus) 之危害 (Hamada & Jonsson 2013)。而植物荷爾蒙水楊酸以 0.02% 及 0.01% 濃度施用於小麥，可有效抑制蚜蟲數量並增加小麥產量 (Mahmoud & Mahfouz 2015)。由水楊酸合成路徑生成的水楊酸甲酯 (methyl salicylate)，可誘導活化植物水楊酸防禦反應，達到抗病的效果。水稻種子施用水楊酸甲酯，除增加植體生長發育速度外，且降低稻熱病之危害 (Kalaivani *et al*. 2016)。水稻施用 0.01% 水楊酸甲酯，則可有效抑制瘤野螟 [*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)] 的生長與發育 (Kalaivani *et al*. 2018)。此外，水楊酸甲酯也可誘引多種蚜蟲的天敵 (James 2003; James & Price 2004; Zhu & Park 2005)。氯化膽鹼 (choline chloride) 是一種植物生長調節劑，施用於植物可提高植物光合作用速度與產量、促進開根與塊莖產量與品質，以及增進超氧歧化酶 (superoxide dismutase)、過氧化氫酶 (catalase) 和過氧化酶 (peroxidase) 的活性等，有利於植物的產量與應對生物與非生物壓力之防禦反應 (Wang & Xiao 2009; Wang *et al*. 2010)。

棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 是世界性重要作物害蟲，在台灣棉蚜全年發生 (Shu 1980; Blackman & Eastop 1984; Tao 1990)。棉蚜因體型小、生活史短，繁殖能力強，一旦田間環境適宜，短時間其族群能迅速增加，嚴重危害植體 (Yu *et al*. 1997)。如能藉由誘導植物防禦反應，減緩棉蚜族群發展，則有利田間天敵作用與減少後續的防治投入 (Peñaflor & Bento 2013; Stenberg *et al*. 2015)。

至目前為止尚無小黃瓜 (*Cucumis anguria* Linnaeus) 施用水楊酸、水楊酸甲酯及氯化膽鹼混合溶液對棉蚜影響之評估資料。因此，本研究以小黃瓜為供試作物，評估小黃瓜施用水楊酸、水楊酸甲酯及氯化膽鹼混合溶液後，對小黃瓜生長、延緩棉蚜族群數量及增加對棉蚜天敵吸引的影響與效果。藉由此項研究，期望未來能發展利用此類誘導防禦物質，用於棉蚜的防治工作。

材料與方法

蟲源及飼育方法

本試驗所使用的棉蚜來自行政院農委會農業試驗所植病組余志儒博士研究室，係 1992 年採集自彰化甜瓜田區並不定期混入田間族群飼養。所得的棉蚜於室內繁殖後供後續試驗用，棉蚜飼育方式參考 Yu & Chen (2001) 的方法，但改以「秀燕」(‘Xiu yan’) 小黃瓜作為棉蚜繁殖植物。

供試植株及栽培管理

供試小黃瓜「新蜜」 (‘Xin mi’) 購自德城行有限公司 (台灣台北市)，「秀燕」及「阿秀」(‘A xiu’) 等品種均購自農友種苗股份有限公司 (台灣高雄市)。室內試驗之小黃瓜植株，分別種植於 2 種尺寸塑膠盆中 (室內試驗者種植於直徑 9 cm、高 6 cm 的塑膠盆，戶外試驗者則種植於直徑 19 cm、高 21 cm 的塑膠盆)，種植環境為 25℃ ± 1℃定溫養蟲室，光照 12 h (上午 6 h 至下午 6 h)，相對濕度 75% ± 5%。待小黃瓜植株生長至具有 2 片真葉後 (約 14–16 d)，供後續試驗使用。

供試資材、藥劑及配製方法

本試驗所使用的水楊酸 (99% powder)、水楊酸甲酯 (99% solution)、氯化膽鹼 (98% powder) 及無水酒精 (ethanol) 等，均購買自台灣默克股份有限公司 (台灣台北市)。派滅淨 (pymetrozine, 50% 水分散性粒劑) 購自興農股份有限公司 (台灣台中市)。泥炭土 (Potgrond H, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany)、塑膠盆 (直徑 9 cm、高 7 cm 及直徑 19 cm、高 21 cm)、透明玻璃樣本瓶 (直徑 2 cm、高 6 cm) 及透明壓克力箱 (40 cm × 40 cm × 40 cm) 均購自振詠興業公司 (台灣台中市)。本試驗所使用 0.01% 水楊酸、水楊酸甲酯及氯化膽鹼混合溶液 (以下稱為 0.01% SMC) 調製為先將 0.2 g 水楊酸及 0.2 mL 水楊酸甲酯，加

入 2 mL 無水酒精中均勻混合後，將混合液及 0.2 g 氯化膽鹼加自來水至 2 L 後，經充分混合備用。派滅淨則參考植物保護手冊推薦使用濃度，以自來水稀釋 4,000× 使用。

下述各種處理試驗均進行 20 重複，每種處理均分別以 0.1% 無水酒精為酒精對照組，且以不經任何處理小黃瓜植株為空白對照組。

評估以不同方式施用 0.01% SMC 後對棉蚜的影響

評估 0.01% SMC 以不同方式施用於小黃瓜植株後，對棉蚜影響之室內試驗為參考 Hamada & Jonsson (2013) 的試驗方法。試驗材料為「秀燕」小黃瓜，其中種子浸泡 (seed soaking) 試驗為將 10 mL 0.01% SMC 加入透明玻璃樣本瓶中，放入小黃瓜種子，經 2 h 後，將小黃瓜種子植入含泥炭土之塑膠盆中，再移至定溫養蟲室。室內溫度 25℃ ± 1℃，光照 12 h。待小黃瓜已長出 2 片真葉後，參照 Yu *et al*. (1997) 所使用方法，於第一片真葉上接入 10 隻 1 日齡棉蚜，經 10 d 後，觀察記錄小黃瓜植株上棉蚜數量。

噴施試驗 (spraying) 為於小黃瓜植株發芽後第 1、8 及 15 d 時，分別噴施 10 mL 0.01% SMC 1 次，3 次處理後，後續方法同種子浸泡試驗。

澆灌試驗 (irrigating) 方法同噴施試驗，惟分別澆灌 20 mL 0.01% SMC 1 次。

揮發性試驗 (volatile) 則為將已有 2 片真葉小黃瓜植株放入透明壓克力箱中，壓克力箱內上方先放置 1 張直徑 9 cm 濾紙 (已添加 100 μL 0.01% SMC)。經 2 h 後，將小黃瓜植株自壓克力箱移出，後續方法同種子浸泡試驗。

評估施用 0.01% SMC 後對棉蚜的持效影響

室內評估施用 0.01% SMC 於小黃瓜植株，調查對棉蚜持效性影響。將「秀燕」小黃瓜植株於發芽後第 1、8 及 15 d 時，分別噴施 10 mL 0.01% SMC 各 1 次，共 3 次處理。分別於完成處理後，經 1 d 及 1、2、3、4 及 5 wk，後續方法同種子浸泡試驗。

評估多次施用 0.01% SMC 後對棉蚜的影響

室內評估 0.01% SMC 連續施用於小黃瓜植株對棉蚜影響，為將「秀燕」小黃瓜植株每週分別噴施 10 mL 0.01% SMC 1 次，連續處理 5 wk，分別於第 1、2、3、4 及 5 wk 噴施後，後續方法同種子浸泡試驗。

評估 0.01% SMC 施用於不同品種小黃瓜對棉蚜的影響

室內評估 0.01% SMC 施用於不同品種小黃瓜對棉蚜的影響，為於「秀燕」、「阿秀」及「新蜜」等小黃瓜植株，分別噴施 0.01% SMC 後，後續方法同種子浸泡試驗。

評估 0.01% SMC 施用於不同品種小黃瓜對小黃瓜植株的影響

戶外評估施用 0.01% SMC 後，其對不同品種小黃瓜植株影響的探討，係將「秀燕」、「阿秀」及「新蜜」等小黃瓜植株盆栽分別置於戶外，每週噴施 1 次 0.01% SMC，連續噴施 3 次。自第 1 次噴藥後，每週觀察與量測記錄小黃瓜的株高、葉片數及花數，連續 6 次。

評估 0.01% SMC 施用於不同品種小黃瓜對棉蚜及其天敵的影響

戶外評估 0.01% SMC 施用於 3 種不同品種小黃瓜植株，調查其對棉蚜及其天敵的影響，係將「秀燕」、「阿秀」及「新蜜」小黃瓜植株盆栽置於戶外，每週噴施 1 次 0.01% SMC，連續噴施 3 次。自第 1 次噴藥後第 1、8、15、22 及 29 d 時，分別觀察與記錄 3 種不同品種小黃瓜植株上棉蚜及其天敵 (包括蜘蛛、食蚜蠅幼蟲、瓢蟲成蟲及幼蟲、草蛉成蟲及幼蟲與寄生蜂等) 發生數量，以噴施派滅淨為農藥處理組。

統計與分析

試驗所得各項數據，先以 SAS-EG (Version 7.1, 2014) 統計分析軟體，進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，再以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD

test) 進行事後檢定，分析各處理間的差異顯著性。0.01% SMC 處理組所得資料經分析後，同時與 0.1% 酒精正對照組及不經任何處理小黃瓜植株的空白對照組比較，均有顯著差異，方視為與對照組間呈顯著差異。

結果

評估以不同方式施用 0.01% SMC 後對棉蚜的影響

分別以噴施、揮發、種子浸泡及澆灌等方法處理 0.01% SMC 後，「秀燕」小黃瓜植株上棉蚜數量分別為 638.7、680.0、568.0 及 626.0 隻，均顯著低於 2 個對照組。各不同方式施用 0.01% SMC 處理中，酒精對照組與空白對照組間棉蚜數量則均無顯著差異 (表 1)。

評估施用 0.01% SMC 後對棉蚜的持效影響

經 0.01% SMC 噴施處理後，1 d 及 1、2、3、4 及 5 wk 的調查結果顯示，「秀燕」小黃瓜植株上棉蚜平均數量，分別為 543.2、582.0、592.3、447.7、557.0 及 307.1 隻，均分別顯著低於 2 個對照組。各不同天數調查中，酒精對照組與空白對照組間棉蚜平均數量，則均無顯著差異 (表 2)。

評估多次施用 0.01% SMC 後對棉蚜的影響

分別經噴施 0.01% SMC 處理 1、2、3、4、5 及 6 次後，結果顯示「秀燕」小黃瓜植株上棉蚜數量均顯著低於對照組，平均蚜蟲數量分別為 842.1、789.6、592.1、575.0、512.0 及 435.2 隻。經 0.01% SMC 不同噴施次數處理後，酒

表 1. 0.01% SMC 不同方式誘導處理小黃瓜植株後對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響。

Table 1. Effect of cucumber seedlings treated with different 0.01% SMC treatments on the cotton aphids (*Aphis gossypii* Glover).

	Mean number of cotton aphids (± SE)		
Treatment	SMC[z]	Ethanol	CK[y]
Spraying	638.7 (10.1) b[x]	964.0 (16.9) a	998.0 (16.7) a
Volatile	680.0 (20.8) b	944.7 (12.3) a	1,002.7 (35.2) a
Seed soaking	568.0 (28.4) b	972.0 (17.9) a	927.3 (23.0) a
Irrigating	626.0 (16.8) b	969.0 (29.2) a	947.7 (18.7) a

[z] SMC: 0.01% salicylic acid, methyl salicylate and choline chloride mixture.
[y] CK: control check.
[x] For each row, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected least significant difference test). Aphid number data was logarithmic transformed prior to the analysis.

表 2. 小黃瓜植株經導處理後對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響持續性。

Table 2. Effect persistence of induced treatment on cucumber seedlings to cotton aphids (*Aphis gossypii* Glover).

	Mean number of cotton aphids (± SE)		
Treatment	SMC[z]	Ethanol	CK[y]
1 d	543.2 (21.9) b[x]	974.3 (18.6) a	1,004.6 (35.2) a
1 wk	582.0 (25.7) b	1,084.4 (72.3) a	1,059.7 (40.5) a
2 wk	592.3 (17.1) b	974.9 (15.6) a	1,009.0 (40.0) a
3 wk	447.7 (24.0) b	849.7 (56.2) a	857.3 (61.1) a
4 wk	557.0 (24.1) b	957.1 (64.8) a	924.0 (28.5) a
5 wk	307.1 (17.1) b	570.4 (33.9) a	554.3 (20.3) a

[z] SMC: 0.01% salicylic acid, methyl salicylate and choline chloride mixture.
[y] CK: control check.
[x] For each row, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected least significant difference test). Aphid number data was logarithmic transformed prior to the analysis.

精對照組與空白對照組間棉蚜平均數量均分別無顯著差異 (表 3)。

評估 0.01% SMC 施用於不同品種小黃瓜對棉蚜的影響

經 0.01% SMC 噴施處理「新蜜」、「秀燕」及「阿秀」等小黃瓜植株後，結果顯示各品種植株上的平均棉蚜數量均顯著低於對照組，分別為 273.5、450.1 及 912.3 隻。各不同品種試驗中，酒精對照組與空白對照組間棉蚜平均數量則均無顯著差異 (表 4)。

評估施用 0.01% SMC 對小黃瓜植株的影響

經 0.01% SMC 噴施處理「新蜜」、「秀燕」及「阿秀」等小黃瓜品種，在平均植株之高度、葉片數及花數均顯著高於各自品種之對照組，各不同品種處理中酒精對照組與空白對照組間小黃瓜植株高度、葉片數及花數，則均無顯著差異 (表 5)。

評估 0.01% SMC 施用後對棉蚜及其天敵的影響

於戶外經 0.01% SMC 噴施處理後，「新蜜」、「秀燕」及「阿秀」等小黃瓜植株於試驗進行後第 29 d，植株上平均棉蚜數量均顯著低於對照組，但均顯著較派滅淨處理組高；而累計調查到棉蚜天敵 (包括蜘蛛、食蚜蠅幼蟲、瓢蟲成蟲及幼蟲、草蛉成蟲及幼蟲與寄生蜂等) 數量，均顯著高於對照組與派滅淨處理組。各不同品種處理中酒精對照組與空白對照組間小黃瓜植株上棉蚜數量及累計天敵數量，則均無顯著差異 (表 6)。

表 3. 小黃瓜植株經多次誘導處理後對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響。

Table 3. Effect of continuously induced treatment on cucumber seedlings to cotton aphids (*Aphis gossypii* Glover).

	Mean number of cotton aphids (± SE)		
Treatment	SMC[z]	Ethanol	CK[y]
1 time	842.1 (12.3) b[x]	1,050.3 (32.5) a	1,015.7 (31.5) a
2 times	789.6 (19.4) b	1,002.0 (17.1) a	987.6 (12.1) a
3 times	592.1 (15.9) b	1,056.0 (25.9) a	1,075.3 (20.7) a
4 times	575.0 (20.2) b	1,061.3 (20.9) a	1,120.0 (30.1) a
5 times	512.0 (21.1) b	954.3 (37.8) a	895.1 (35.5) a
6 times	435.2 (13.3) b	807.3 (27.4) a	776.2 (35.1) a

[z] SMC: 0.01% salicylic acid, methyl salicylate and choline chloride mixture.
[y] CK: control check.
[x] For each row, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected least significant difference test). Aphid number data was logarithmic transformed prior to the analysis.

表 4. 不同品種小黃瓜植株經誘導處理後對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響。

Table 4. Effect of induced treatment on different cucumber cultivar seedlings to cotton aphids (*Aphis gossypii* Glover).

	Mean number of cotton aphids (± SE)		
	Treatment		
Cultivar	SMC[z]	Ethanol	CK[y]
'Xin mi'	273.5 (13.2) b[x]	607.0 (46.7) a	573.6 (28.2) a
'Xiu yan'	450.1 (14.6) b	811.3 (15.7) a	788.5 (19.3) a
'A xiu'	912.3 (31.2) b	1,040.7 (44.6) a	1,078.2 (67.3) a

[z] SMC: 0.01% salicylic acid, methyl salicylate and choline chloride mixture.
[y] CK: control check.
[x] For each row, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected least significant difference test). Aphid number data was logarithmic transformed prior to the analysis.

表 5. 三種不同品種小黃瓜植株經誘導處理後對生長之影響。

Table 5. Effect of induced treatment on three different cucumber cultivar seedlings growth.

Treatment[z]	Mean height (cm) of cucumber plant (± SE)	Mean number of leaves (± SE)	Mean number of flowers (± SE)
	Cultivar-'Xin mi'		
SMC	60.0 (0.6) a[y]	30.4 (0.4) a	6.4 (0.2) a
Ethanol	45.2 (0.5) b	22.0 (0.3) b	1.4 (0.1) b
CK	45.6 (0.4) b	21.8 (0.2) b	1.2 (0.1) b
	Cultivar-'Xiu yan'		
SMC	75.2 (1.3) a	19.8 (0.2) a	4.6 (0.2) a
Ethanol	48.6 (0.6) b	18.0 (0.3) b	3.2 (0.3) b
CK	48.8 (0.5) b	18.0 (0.2) b	3.2 (0.2) b
	Cultivar-'A xiu'		
SMC	67.6 (0.9) a	18.4 (0.3) a	5.6 (0.4) a
Ethanol	56.2 (0.4) b	17.0 (0.3) b	3.4 (0.2) b
CK	55.8 (1.0) b	16.8 (0.2) b	3.2 (0.1) b

[z] SMC: 0.01% salicylic acid, methyl salicylate and choline chloride mixture; CK: control check.
[y] For each cucumber cultivar column, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected least significant difference test).

表 6. 不同品種小黃瓜植株經誘導處理後對棉蚜及天敵之影響。

Table 6. Effect of induced treatment on cotton aphid and natural enemies on different cucumber cultivar.

Treatment[z]	Mean number of cotton aphids on Day 29 (± SE)	Mean cumulative number of natural enemies (± SE)
	Cultivar-'Xin mi'	
Pymetrozine	18.0 (4.2) c[y]	17.0 (5.6) c
SMC	227.6 (4.3) b	67.2 (4.8) a
Ethanol	342.6 (8.6) a	45.7 (9.6) b
CK	338.0 (8.0) a	43.1 (8.3) b
	Cultivar-'Xiu yan'	
Pymetrozine	25.3 (3.8) c	10.4 (4.2) c
SMC	337.4 (4.0) b	40.6 (7.6) a
Ethanol	416.4 (4.8) a	22.4 (4.8) b
CK	421.2 (4.0) a	25.2 (6.3) b
	Cultivar-'A xiu'	
Pymetrozine	27.8 (6.4) c	7.2 (2.8) c
SMC	472.7 (5.8) b	27.6 (3.6) a
Ethanol	523.7 (6.6) a	15.3 (2.6) b
CK	526.7 (7.6) a	13.6 (3.8) b

[z] Pymetrozine: 50% pymetrozine (WG) diluted 4,000× with running water; SMC: 0.01% salicylic acid, methyl salicylate and choline chloride mixture; CK: control check.
[y] For each cucumber cultivar column, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected least significant difference test). Number of natural enemies (included spider, hover fly larvae, lady beetle adult and larvae, lacewing larvae and parasitoids) was cumulative number for 29 d and square transformed prior to the analysis.

討論

0.01% SMC 以噴施、揮發、種子浸泡及澆灌等方式，處理小黃瓜植株後均能減緩棉蚜數量增長，各處理方式的平均棉蚜數量分別約

為對空白照組的 64.0、67.8、61.3 及 66.1%。顯示小黃瓜植株可以經由空氣、葉片及根部等多種方式感受 0.01% SMC，並產生反應，此點有助於未來的田間應用潛力。Hamada & Jonsson (2013) 測試能誘導水楊酸防禦反應的維生素 B1 (thiamine) 對稻麥蚜的影響，分別以種子浸泡、噴施、澆灌及揮發等方式處理後，經 7 d 後稻麥蚜的平均數量約為對照組的 60%，亦證實植物可經由不同方式感知誘導物質。但經 0.01% SMC 處理後，發現小黃瓜植株上的棉蚜並無死亡現象，顯示此處理只能誘導植株防禦反應，但對棉蚜並無直接致死效果。

小黃瓜經 0.01% SMC 噴施處理後，對棉蚜的誘導防禦效果可持續至少 5 wk，此與 Mauch-Mani *et al*. (2017) 的研究結果相似。誘導植物的防禦基因表現，可使植物獲得對害蟲及病原持久的抗性 Worrall *et al*. (2012)。將番茄 (*Solanum lycopersicum* Linnaeus, cv. Carousel) 種子浸泡於 3 mM 茉莉花酸或 18 mM β- 氨基丁酸 (β-aminobutryric acid) 溶液中，種子經浸泡處理後的番茄植株，對二點葉蟎 (*Tetranychus urticae* Koch)、菸草天蛾 (*Manduca sexta* Linnaeus)、桃蚜 (*Myzus persicae* Sulzer) 及番茄白粉病菌 (*Oidium neolycopersici* L. Kiss) 的抗性可持續 8 wk。本研究中 0.01% SMC 噴施於小黃瓜植株 1 次，即可誘導小黃瓜植株對棉蚜產生持效抗性至少 5 wk，未來可進一步於田間測試 0.01% SMC 的持續效果性，作為開發應用之參考。

0.01% SMC 施用於「新蜜」、「秀燕」及「阿秀」等 3 種不同品種的小黃瓜後，雖然皆可誘導對棉蚜的抗性，但各處理組植株上平均棉蚜數量，分別約為空白對照組的 47.7、57.1 及 84.6%，顯示出 0.01% SMC 施用於不同品種小黃瓜之效果差異性。研究顯示，植物的代謝產物能提供植物生長發育與對抗生物及非生物環境壓力所需 (Herms & Mattson 1992)，但當育種目的為提高作物產量時，可能會因此喪失特定的防禦物質，降低作物對植食昆蟲的防禦能力，進而影響誘導防禦物質的表現 (Rosenthal & Dirzo 1997)。Dong & Hwang (2016) 亦發現 4 種不同品種小黃瓜於減緩棉蚜數量增長的效果上有差異，由高至低分別是「新蜜」、「秀燕」、「夏之輝」及「阿秀」品種。因此，欲將 0.01% SMC 應用於田間前，必須先考量作物不同品種效果差異性影響。

施用 0.01% SMC 後，發現能增加「新蜜」、「秀燕」及「阿秀」等 3 種不同品種小黃瓜生長速度，4 wk 後比對照組擁有較高的植株高度、葉片數與花數。施用水楊酸已知能增進植物生長，大豆 (*Glycine max* Linnaeus cv. Cajeme) 芽噴施 10 nM 及 100 μM 水楊酸經 7 d 後，芽和根的生長分別增加約 25% 及 45% (Gutiérrez-Coronado *et al*. 1998)。除水楊酸外，氯化膽鹼也已知具有調節植物生長的作用，於馬鈴薯生產上施用氯化膽鹼可促進開根、塊莖產量與品質 (Wang *et al*. 2010)。本試驗結果亦證實，施用 0.01% SMC 後，除誘導小黃瓜對棉蚜的抗性外，亦具促進小黃瓜生長效果。

戶外試驗於「新蜜」、「秀燕」及「阿秀」等小黃瓜植株噴施 0.01% SMC 後，調查累計棉蚜天敵數量均顯著高於對照組及派滅淨處理組，此可能因為 0.01% SMC 中含有水楊酸甲酯成分，此成分已經證實為害蟲天敵誘引物質 (James 2003; James & Price 2004)。但 0.01% SMC 處理三品種小黃瓜植株後，平均棉蚜數量分別約為各自空白對照組的 67.3、80.1 及 89.7%，且均顯著較派滅淨處理組的棉蚜數量為高，約分別為 12.6、13.3 及 17.0 倍，顯示 0.01% SMC 對棉蚜族群的抑制效果並無法達到化學農藥的速效性。但因 0.01% SMC 同時具促進小黃瓜生長及延緩棉蚜數量增加之效果，具潛力作為非農藥防治的輔助措施與資材，藉由減緩棉蚜數量增加速度，進而減少防治措施投入次數或提升生物防治效果 (Peñaflor & Bento 2013; Stenberg *et al*. 2015)。

綜合本試驗結果，0.01% SMC 施用於小黃瓜植株，證實可延緩棉蚜數量增加、促進小黃瓜生長及吸引棉蚜天敵。且小黃瓜植株噴施 1 次 0.01% SMC 後，即可產生延緩棉蚜數量增加效用，雖對棉蚜並無致死效果，但具潛力可開發做為非農藥防治的輔助措施。未來找尋對蚜蟲有致死效果的誘導物質如 DL-β-aminobu-

tyric acid (BABA)，其可誘導蠶豆 (*Vicia faba* Linnaeus) 增加碗豆蚜 (*Acyrthosiphon pisum* Harris) 死亡率 (Hodge *et al*. 2005) 以提升誘導防禦物質於田間防治害蟲的應用性。

引用文獻

Blackman, R. L. and V. F. Eastop. 1984. Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide. Wiley. New York. 466 pp.

Conrath, U. 2009. Priming of induced plant defense response. Adv. Bot. Res. 51:361–395.

Dong, Y. J. and S. Y. Hwang. 2016. Defense of four cucumber cultivars to the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glover). J. Taiwan Agric. Res. 65:374–383. (in Chinese with English abstract)

Gutiérrez-Coronado, M. A., C. Trejo-López, and A. Larqué-Saavedra. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. Plant Physiol. Biochem. 36:563–565.

Hamada, A. M. and L. M. V. Jonsson. 2013. Thiamine treatments alleviate aphid infestations in barley and pea. Phytochemistry 94:135–141.

Herms, D. A. and W. J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: To grow or defend. Q. Rev. Biol. 67:283–335.

Hodge, S., G. A. Thompson, and G. Powell. 2005. Application of DL-β-aminobutyric acid (BABA) as a root drench to legumes inhibits the growth and reproduction of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). Bull. Entomol. Res. 95:449–455.

Howe, G. A. and G. Jander. 2008. Plant immunity to insect herbivores. Annu. Rev. Plant Biol. 59:41–66.

James, D. G. 2003. Synthetic herbivore-induced plant volatiles as field attractants for beneficial insects. Environ. Entomol. 32:977–982.

James, D. G. and T. S. Price. 2004. Field-testing of methyl-salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. J. Chem. Ecol. 30:1613–1628.

Kalaivani, K., M. M. Kalaiselvi, and S. Senthi-Nathan. 2016. Effect of methyl salicylate (MeSA), an elicitor on growth, physiology and pathology of resistant and susceptible rice varieties. Sci. Rep. 6:34498.

Kalaivani, K., M. M. Kalaiselvi, and S. Senthil-Nathan. 2018. Effect of methyl salicylate (MeSA) induced changes in rice plant (*Oryza sativa*) that affect growth and development of the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 101:116–126.

Kaloshian, I. and L. L. Walling. 2005. Hemipterans as plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43:491–521.

Mahmoud, F. M. and H. M. Mahfouz. 2015. Effects of salicylic acid elicitor against aphids on wheat and detection of infestation using infrared thermal imaging technique in Ismailia, Egypt. Pestic. Phytomed. 30:91–97.

Mauch-Mani, B., I. Baccelli, E. Luna, and V. Flors. 2017. Defense priming: An adaptive part of induced resistance. Annu. Rev. Plant Biol. 68:485–512.

Mithöfer, A. and W. Boland. 2012. Plant defense against herbivores: Chemical aspects. Annu. Rev. Plant Biol. 63:431–450.

Peñaflor, M. F. G. V. and J. M. S. Bento. 2013. Herbivore-induced plant volatiles to enhance biological control in agriculture. Neotrop. Entomol. 42:331–343.

Pichersky, E. and E. Lewinsohn. 2011. Convergent evolution in plant specialized metabolism. Annu. Rev. Plant Biol. 62:549–566.

Rosenthal, J. P. and R. Dirzo. 1997. Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defense against insects: Evidence from maizes and wild relatives. Evol. Ecol. 11:337–355.

Shu, T. C. 1980. Contributions to the study of Aphididae of Taiwan. Ph.D. dissertation, National Taiwan University. Taipei. 282 pp. (in Chinese with English abstract)

Stenberg, J. A., M. Heil, I. Åhman, and C. Björkman. 2015. Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. Trends Plant Sci. 20:698–712.

Tao, C. C. 1990. Aphid-fauna of Taiwan Province, China. Taiwan Provincial Museum Press. Taipei. 327 pp. (in Chinese)

Wang, H. and L. Xiao. 2009. Effects of chlorocholine chloride on phytohormones and photosynthetic characteristics in potato (*Solanum tuberosum* L.). J. Plant Growth Regul. 28:21–27.

Wang, H., L. Xiao, J. Tong, and F. Liu. 2010. Foliar application of chlorocholine chloride improves leaf mineral nutrition, antioxidant enzyme activity, and tuber yield of potato (*Solanum tuberosum* L.). Sci. Hort. 125:521–523.

Worrall, D., G. H. Holroyd, J. P. Moore, M. Glowacz, P. Croft, J. E. Taylor, N. D. Paul, and M. R. Roberts. 2012. Treating seeds with activators of plant defense generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. New Phytol. 193:770–778.

Yu, J. Z. and B. H. Chen. 2001. Effect of concealment and rearing density on the development and survival of *Lemnia biplagiata* (Coleoptera: Coccinellidae). J. Agric. Res. China 50:68–74. (in Chinese with En-

glish abstract)

Yu, J. Z., B. H. Chen, and Y. C. Liu. 1997. Resistance of three muskmelon cultivars to *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). Formosan. Entomol. 17:245–256. (in Chinese with English abstract)

Zhu, J. and K. C. Park. 2005. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. J. Chem. Ecol. 31:1733–1746.

Evaluation of the Effects of Spraying Cucumber Seedlings with Salicylic Acid Mixed Solution (SMC Solution) on Cotton Aphids (*Aphis gossypii* Glover)

Yaw-Jen Dong[1] and Bei-Chen Hsiu[1,*]

Abstract

Dong, Y. J. and B. C. Hsiu. 2020. Evaluation of the effects of spraying cucumber seedlings with salicylic acid mixed solution (SMC solution) on cotton aphids (*Aphis gossypii* Glover). J. Taiwan Agric. Res. 69(1):1–10.

This study presents the effect of 0.01% SMC (0.01% mixed solution of salicylic acid, methyl salicylate and choline chloride) on cucumber seedlings and cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). Significant higher height and number of leaves and flowers were found on the cucumber seedlings sprayed with 0.01% SMC than control. Cotton aphid number from cucumber seedlings treated with 0.01% SMC by spraying, volatile, seed soaking and irrigating were *ca*. 64.0, 67.8, 61.3 and 66.1%, respectively, of that on control cucumber seedlings. Cucumber seedlings sprayed with 0.01% SMC one time could induce defensive effect to cotton aphid and effectiveness lasted 5 wk. Results from outdoor pot tests showed that significant higher cumulative natural enemies number of cotton aphid on the cucumber seedlings 'Xin mi', 'Xiu yan' and 'A xiu' sprayed with 0.01% SMC than control and pesticide treatment; cotton aphid numbers were *ca*. 67.3, 80.1 and 89.7%, respectively, of that on control cucumber seedlings but all significant higher than pesticide treatment. These results revealed that 0.01% SMC could promote growth of cucumber seedlings and reduce cotton aphid infestations. The 0.01% SMC could be as an assistant tool for cotton aphid non-pesticide control program. Farmland tests are necessary to confirm the efficiency of this treatment before further use.

Key words: Cotton aphid, Salicylic acid, Methyl salicylate, Choline chloride, Induced defense.

Received: January 21, 2019; Accepted: April 1, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: bchen@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):11–24 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0002

研究報告

Colletotrichum siamense 引起之荔枝葉部針點病病原特性及防治藥劑篩選

吳昭蓉 [1]　黃巧雯 [2]　張哲瑋 [3]　倪蕙芳 [4,*]

摘要

吳昭蓉、黃巧雯、張哲瑋、倪蕙芳。2020。*Colletotrichum siamense* 引起之荔枝葉部針點病病原特性及防治藥劑篩選。台灣農業研究 69(1):11–24。

荔枝針點病之病原菌為 *Colletotrichum siamense*，可危害荔枝葉片與葉柄，造成黑色針點狀病斑。本研究由雲林古坑「糯米糍」及「桂味」荔枝品種之針點病病斑上分離得 *Colletotrichum* spp.，經形態觀察及分子類緣關係鑑定確認為 *C. siamense*。由先前研究中確認 *C. siamense* 對荔枝「糯米糍」葉部具有病原性，本研究則對荔枝品種「台農 7 號」進行葉部接種，藉此得知本病原菌亦可侵染糯米糍以外之品種。又進行溫度對 *C. siamense* 菌絲生長與孢子發芽影響試驗，結果發現 *C. siamense* 菌絲最適生長溫度為 25–30℃，且在 15℃之低溫時仍可生長；分生孢子則在 20–30℃之間皆可於葉片上萌芽並產生附著器。進行 *C. siamense* 之菌絲生長與分生孢子發芽對化學藥劑之感受性評估，發現腐絕快得寧及甲基多保淨對菌絲生長具有較佳抑制效果，克熱淨及得克利次之；在抑制分生孢子發芽方面，則以腐絕快得寧、腈硫醌及百克敏有較好的抑制能力，亞托待克利及得克利次之。本研究之結果，可提供作為田間荔枝針點病在防治策略及藥劑施用上之參考。

關鍵詞：荔枝、針點病、藥劑篩選。

前言

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonnerat) 為無患子科 (Sapindaceae) 果樹，原生於中國嶺南地區，栽培歷史已超過 2,000 年，主要分布在南北迴歸線內亞熱帶及熱帶地區之中海拔冷涼山區，世界總種植面積約為 80 萬公頃。栽培面積最大的區域為中國大陸，占全世界 80% 以上。荔枝引進台灣已超過 300 多年，目前已成為台灣栽培面積第三大的果樹，根據農委會 2017 年統計年報 (https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx) 顯示，全台栽培面積約 9,984 ha，總產量 59,796 Mg。主要栽培地區，按栽培面積大小依序分布在高雄市、台中市、台南市、南投縣及嘉義縣，主要栽培品種為「玉荷包」、「黑葉」、「糯米糍」、「桂味」等。

由於荔枝主要產期為 5–7 月，正值高溫多濕的梅雨季，常遭受病蟲之危害，導致產量及品質嚴重降低。已有紀錄的荔枝病害，有由 *Peronophythora litchii* 引起的露疫病 (Kao & Leu 1980; Ann & Ko 1984)，由 *Geotrichum ludwigii* 及 *Geotrichum candidum* 引起的酸腐病 (Tsai & Hsieh 1998)，由 *Phellinus noxius* Corner 引起的褐根病 (Ann *et al.* 1999)，由 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的炭疽病 (Yang 1990; Anderson & Coates 2009)，由 *Colletotrichum siamense* 引起之針點病 (Ni *et al.* 2017)，以及由 *Lasiodiplodia theo-*

投稿日期：2019 年 6 月 3 日；接受日期：2019 年 9 月 22 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所園藝系研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

bromae 引起的果腐病等 (Ann *et al*. 2004; Tzean *et al*. 2019)。其中，針點病的病徵在台灣首先由 Ann *et al*. (2004) 在「桂味」發現，但未以中文定名，病徵為果實上出現密布褐色針尖狀小點。Ni *et al*. (2017) 後來亦於「糯米糍」及「桂味」荔枝葉片上，發現類似黑色針尖狀小點病徵 (圖 1)，藉由病原菌分離、柯霍氏法則驗證及病原形態與分子鑑定，確認葉部針點病乃由 *C. siamense* 所引起。

此病害在澳洲荔枝果園普遍發生，稱為 pepper spot disease，先前報導認為是由 *C. gloeosporioides* 引起 (Cooke & Coates 2002)。澳洲之荔枝針點病於 1982 年被發現，於 1989 年被正式記錄，在大多數澳洲荔枝產區均可發生。之所以稱為 pepper spot disease，乃由於此病害所引起之病徵為小於 1 mm 直徑的密集黑點。在澳洲，被感染的荔枝品種已知有 'Kwai May Pink'、'Bengal'、'Salathiel'、'Wai chee' 以及 'Tai So' (Drew & Drew 2001)。此病害與一般果實採後發生之炭疽病不同，並非潛伏感染，因此一般在未熟果便會出現病徵。雖然此病害不會深入果肉，但仍會影響果實轉色，大幅降低商品品質。由於本病害並未進行中文訂名，以其

圖 1. 由 *Colletotrichum siamense* 引起「糯米糍」品種荔枝針點病之病徵。針頭狀黑點出現於葉片上。

Fig. 1. Pepper spot disease on lychee 'No mi ci' caused by *Colletotrichum siamense*. The little black spots appear on leaves.

病徵表現，本研究以針點病稱之。類似病害在其他果樹亦有發生，如在澳洲 'Hass' 品種之酪梨 (Willingham *et al*. 2000)、在南非的 'Pinkerton' 及 'Hass' 品種酪梨 (Schoeman & Manicom 2000) 均曾有相關報告。

為釐清荔枝葉部針點病發生生態及病原特性，本研究進行病原菌形態觀察，並探討本病害病原菌菌絲生長及分生孢子發芽適溫、病原菌在罹病組織內的殘存情形及防治藥劑篩選，作為未來針點病發生時之防治參考。

材料與方法

病原菌之收集與保存

本研究測試之菌株來自雲林縣古坑鄉之荔枝園，由感染針點病的荔枝葉及荔枝果實上分離而得。分離的方式為將罹病組織以 75% 酒精及 0.6% 次氯酸鈉消毒後，再以無菌水漂洗 3 次，切取病健部組織置放在 pH 3.8 之含乳酸之 potato dextrose agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany) 培養基上 [acidified PDA，高溫滅菌後之 300 mL PDA 培養基，降溫後加入 750 µL 50% (v/v) 乳酸溶液 (lactic acid)]。待菌絲長出後，切取菌絲尖端培養在 PDA 培養基上。產孢後，進行單孢分離並培養在水瓊脂培養基 (water agar) 上，待菌落大小約至培養皿直徑三分之二時，將含菌絲之培養基切成小塊，置於含 1 mL 無菌水之保存管中，在 25℃ 及 10℃溫度下各儲放 1 支備用。本研究所用之菌株編號 C-997 與 C-1001 菌株，來自於雲林縣古坑鄉「桂味」品種，C-1133 來自雲林縣古坑鄉「糯米糍」品種。

病原菌分子鑑定

C-1001 先前已由形態及分子鑑定為 *C. siamense* (Ni *et al*. 2017)，C-997 及 C-1133 菌株則於本研究進行形態記錄外，並以貝氏分析 (Bayesian inference) 進行演化樹建構。所使用的基因有 actin (ACT)、calmodulin (CAL)、chitin synthase (CHS)，以及 glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)。核酸萃取及增幅方式如下，首先將待測菌株培養於 PDA 培養基上，待菌絲長出後，刮取菌絲置於 1.5 mL 微量離心管

中，加入 0.5 N NaOH 溶液。以均質機將菌絲磨碎後，離心並吸取上清液。繼而加入 9× 體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)。進行混合後做為 PCR 反應之核酸模板 (Tsai 2005)，以 Phusion High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) 聚合酶酵素進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應。ACT 片段所用引子對為 ACT-512F 及 ACT-783R (Carbone & Kohn 1999)，CAL 片段所用引子對為 CL1C 及 CL2C (Weir *et al*. 2012)，CHS 片段所用引子對為 CHS-79F 及 CHS-345R (Carbone & Kohn 1999)，GAPDH 片段所用引子對為 GDF 和 GDR (Templeton *et al*. 1992)。增幅後產物委由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taiwan) 進行定序，定序結果登錄於 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站 GenBank 資料 (表 1)。

由 NCBI 網站 GenBank 資料庫下載共同分析之序列，進行多基因演化分析。各基因先以 ClustalX v. 2.1 軟體 (Larkin *et al*. 2007) 進行序列排列 (alignment) 後，以 jModeltest 進行 DNA 替換模型 (DNA substitution model) 最佳化運算，採用貝氏資訊準則方法 (Bayesian information criterion) 分析得到之 DNA 替換模型，將其應用於演化樹之建構。以 SequenceMatrix v. 1.7.8 軟體 (Vaidya *et al*. 2011) 將各基因序列相接，並以 MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist *et al*. 2012) 進行樹型建構。進行 2 次分析，每次分析 1×10^7 個世代 (generations)，每 10,000 個世代取 1 棵分析。為求分析準確，捨棄前 25% 世代。參數的趨同性，以 Tracer 軟體 (Rambaut & Drummond 2007) 進行檢驗。

病原菌形態觀察

將 *C. siamense* 菌株之菌絲塊移植 PDA 平板進行 3–4 d 活化後，切取菌落邊緣至 PDA 上培養，於 12 h 近紫外燈 (TL-D 18W BLB, Philip, Eindhoven, The Netherland) 光照及 25℃環境下培養 7 d。以移植環挑取菌落孢子置於載玻片上，以干涉位相差顯微鏡 (differential interference contrast, DIC, Nikon 80i, Tokyo, Japan) 觀察孢子形態並拍照紀錄。

接種源製備

由保存管將 *C. siamense* 菌株之菌絲塊移植 PDA 平板進行活化，於 25℃無光照之恆溫箱中培養 3–4 d。切取菌絲尖端，繼而移植至 PDA 平板。在 25℃下以 12 h 近紫外光照射及 12 h 黑暗週期培養 3–5 d。待其產孢後，以無菌水洗下培養皿內產生之分生孢子，並利用血球計數器 (Neubauer Assistent improved Bright-Line hemacytometer, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Germany) 測定孢子濃度，再以無菌水調製濃度為 1×10^6 conidia mL^{-1} 之分生孢子懸浮液供試驗接種用。

葉部病原性測試

接種於行政院農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所荔枝園進行，並於新梢期接種。將 *C. siamense* C-1001 及 C-1133 菌株濃度 1×10^6 conidia mL^{-1} 孢子液以噴霧瓶均勻噴霧於荔枝新梢，隨即以塑膠袋套袋進行保濕 2 d。拆袋換成網袋，持續觀察葉片上病徵進展及記錄針點病發生情形。

表 1. *Colletotrichum siamense* C-997、C-1001 及 C-1133 菌株分離之植物組織、孢子大小及基因序列在 GenBank 資料庫之登錄號碼。

Table 1. The isolated sources, conidial sizes and Genbank accession numbers of *Colletotrichum siamense* isolates C-997, C-1001 and C-1133.

			GenBank accession number[z]			
Isolate	Isolated source	Conidial size (μm)	ACT	CAL	CHS	GAPDH
C-997	Leaf	16.52 ± 0.18 × 4.82 ± 0.06	MF098593	MF135495	MF098595	MF098597
C-1001	Fruit	16.08 ± 0.18 × 5.44 ± 0.07	MF098594	MF135496	MF098596	MF098598
C-1133	Fruit	15.34 ± 0.15 × 5.39 ± 0.05	MK863029	MK920228	MK863030	MK863031

[z] ACT: actin; CAL: calmodulin; CHS: chitin synthetase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

葉片病徵及病兆顯微鏡觀察

C. siamense C-1001 菌株接種「台農 7 號」葉片 30 d 後產生具黃暈之黑色針點病斑，以立體數位顯微鏡 (3D digital microscope, Hirox RH-2000, Tokyo, Japan) 觀察病斑外觀，並以桌上型掃描式電子顯微鏡 (tabletop scanning electron microscope, Hitachi TM-1000, Tokyo, Japan) 觀察葉片上 *C. siamense* C-1001 菌株產孢構造。

溫度對 *C. siamense* 菌絲生長、孢子發芽及附著器產生之影響

將供試菌株 C-997 與 C-1001 活化至 PDA 平板上，於 25℃定溫箱培養 3 d 後，切取菌落邊緣再移植至 PDA 平板於 25℃定溫箱培養 4 d 後，以滅菌過之孔徑 0.5 cm 打孔器切取菌落邊緣之菌絲塊供試。將上述直徑 0.5 cm 的菌絲塊菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之 PDA (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 培養基平板中央，分別置於 15、20、25、30、35 及 40℃之定溫箱中黑暗培養，分別於培養 1、3、5 及 7 d。測量其菌絲生長直徑，每處理 6 重複，本試驗重複進行 2 次。

另將炭疽病菌株 C-997 培養於 PDA 培養基，置於 25℃之恆溫箱在近紫外燈照射下 (12 h light/12 h dark) 培養 3–7 d，以無菌水洗下分生孢子，配製濃度為 3×10^4 spores mL^{-1} 分生孢子懸浮液。將分生孢子懸浮液 20 μL 滴於「黑葉」品種荔枝葉片之葉背，每葉片各 4 滴，葉片置於保濕盒後再分別置入 20、25、30 及 35℃之恆溫箱，並於 4、6 及 12 h 分別取出，以 trypan blue 10 μL 染色鏡檢孢子發芽率及產附著器率。

荔枝炭疽病推薦藥劑對 *C. siamense* 菌絲生長之影響

將供試菌株 C-997 與 C-1001 活化至 PDA 平板上於 25℃定溫箱 3 d，切取菌落邊緣再移植至 PDA 平板於 25℃定溫箱培養 4 d。以滅菌過之孔徑 0.5 cm 打孔器切取菌落邊緣之菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所使用 13 種藥劑及種類如下：50.0% 三氟敏水分散性粒劑 (water dispersible granules; WG) (trifloxystrobin，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、62.5% 賽普護汰寧 WG (cyprodinil + fludioxonil，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、80.0% 免得爛 WG (metiram，台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)、40.0% 克熱淨可濕性粉劑 (wettable powders; WP) (iminoctadine triacetate，台灣住友商事股份有限公司，台灣台北市)、53.0% 腐絕快得寧 WP (thiabendazole + oxine-copper，瑞芳植保股份有限公司，台灣嘉義縣)、70.0% 甲基多保淨 WP (thiophanate–methyl，瑞德股份有限公司，台灣台北市)、70.0% 甲基鋅乃浦 WP (propineb，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、23.6% 百克敏乳劑 (emulsifiable concentrate; EC) (pyraclostrobin, 台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)、25.9% 得克利水基乳劑 (emulsion, oil in water; EW) (tebuconazole，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、25.0% 亞托敏水懸劑 (suspension concentrate; SC) (azoxystrobin，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、24.9% 待克利 SC (difenoconazole，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、40.0% 四氯異苯腈 SC (chlorothalonil，瑞德股份有限公司，台灣台北市) 及 42.2% 腈硫醌 SC (dithianon，台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)，配製成含有效成分濃度為 1、10 及 100 mg L^{-1} 之 PDA 培養基，另以不添加藥劑之 PDA 平板作為對照。將上述直徑 0.5 cm 的菌絲塊菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之含藥的 PDA 培養基平板中央，置於 25℃之定溫箱中黑暗培養。俟對照組菌絲長滿，測量其菌絲生長直徑，每處理 6 重複。本試驗重複進行 2 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率：抑制率 (%) = [(對照組平均生長直徑−藥劑處理組平均生長直徑)/對照組平均生長直徑] × 100%。

不同藥劑處理對 *C. siamense* 孢子在葉片上發芽之影響

荔枝炭疽病菌 C-997 菌株於 PDA 培養基 25℃近紫外燈照射下培養 1 wk 後，以無菌水洗下製成孢子懸浮液，經 Miracloth 濾膜 (EMD Millipore Corp., Burlington, MA, USA) 過濾

掉菌絲，以血球計數器計算孢子數。將孢子加無菌水調製為 3 × 10^4 conidia mL^{-1}，吸取 2 μL 孢子懸浮液，置於荔枝葉片之葉背上後。再各加入 30 μL 不同濃度之藥劑，所使用 13 種藥劑及種類如下：62.5% 賽普護汰寧 WG (cyprodinil + fludioxonil，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、40.0% 克熱淨 WP (iminoctadine triacetate，台灣住友商事股份有限公司，台灣台北市)、53.0% 腐絕快得寧 WP (thiabendazole + oxine-copper，瑞芳植保股份有限公司，台灣嘉義縣)、25.0% 亞托敏 SC (azoxystrobin，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、42.2% 腈硫醌 SC (dithianon，台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)、32.5% 亞托待克利 SC (azoxystrobin + difenoconazole，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、50.0% 三氟派瑞 SC (fluopyram + trifloxystrobin，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、70.0% 甲基多保淨 WP (thiophanate–methyl，瑞繐股份有限公司，台灣台北市)、23.6% 百克敏 EC (pyraclostrobin，台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)、25.9% 得克利水基乳劑 EW (tebuconazole，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、34.5% 貝芬菲克利 WP (carbendazim + hexaconazole，惠光化學股份有限公司，台灣台南市)、80.0% 鋅錳乃浦 WP (mancozeb，安農股份有限公司，台灣新北市)、23.7% 依普同 SC (iprodione，萬得發有限公司，台灣台中市)，9.0% 滅特座 EC (metconazole，立農化學股份有限公司，台灣雲林縣) 配製成含有效成分濃度為 1、10 及 100 mg L^{-1}，經 16 h 後加入 10 μL trypan blue 染色後，於顯微鏡下逢機調查 40 個孢子之孢子發芽率，每處理各 5 重複，以無菌水處理做為對照組。

結果

荔枝炭疽病菌 *C. siamense* 培養形態與菌株分子鑑定

荔枝炭疽病菌菌株 C-997、C-1001 及 C-1133 培養於 PDA 上，25℃培養 7 d，C-997 與 C-1133 菌落表面為灰黑輪紋，可見橘色產孢，背面則為淺橘色至橘色；C-1001 菌落表面灰黑輪紋，背面亦為灰黑色 (圖 2)。三菌株之孢子無色、無隔膜、短桿狀，有時一端稍尖，孢子大小約為 15.34–16.52 μm × 4.82–5.39 μm (表 1)。以 ACT、CAL、CHS 及 GAPDH 序列進行分子類緣關係鑑定，發現 3 菌株與 *C. siamense* 類緣關係最接近 (圖 3)。以菌落外觀、孢子形態及類緣關係進行分析 (Weir *et al*. 2012)，確認 3 菌株為 *C. siamense*。另外 3 菌株皆曾經過病原性測試，證明對荔枝具有病原性。

C. siamense 對荔枝「台農 7 號」葉片的病原性

已知 *C. siamense* 可在「糯米糍」品種上造成針點病，為瞭解該病原菌在其他品種上是否可造成發病，於「台農 7 號」荔枝品種之葉片上進行病原性測試。*C. siamense* C-1001 菌株之孢子懸浮液接種於荔枝葉片上，結果於接種後 7 d 出現針點狀典型病斑 (圖 4A)，隨著接種時間的增加，其病斑數逐漸增加。接種後 21 d 病斑發展為具黃暈之褐色小點 (圖 4B)，其後無明顯繼續擴大的現象，僅維持針點狀，接種後 30 d 之病徵如圖 4C，病斑大小約為 268.36 μm × 213.68 μm 至 522.51 μm × 507.75 μm。將病組織以桌上型掃描式電子顯微鏡觀察後，結果可以發現病斑感染點確實有炭疽病菌孢子增殖泌出之情形 (圖 4D)。以 *C. siamense* C-1133 菌株接種後 50 d，「台農 7 號」葉片上病斑外觀為中央灰白色或淺黃色木栓化，周緣褐色 (圖 4E–4F)。為瞭解病斑內病原菌之存活情形，本研究每月對病斑進行組織分離，結果顯示於接種後 9 個月後仍可分離到炭疽病菌，且分離比率仍高達 80%。

溫度對 *C. siamense* 菌絲生長與孢子發芽之影響

以 *C. siamense* C-997 與 C-1001 菌株進行溫度對菌絲生長影響試驗 (圖 5)，結果顯示兩菌株於 25℃及 30℃生長最好，於培養 7 d 時生長直徑可達 7 cm 以上。其次為 20℃，培養 7 d 的生長直徑約 5–6 cm。15℃時生長較遲緩，C-997、C-1001 在 7 d 之生長直徑僅分別為 3.8 cm、4.38 cm。35℃時菌絲生長極為緩慢，

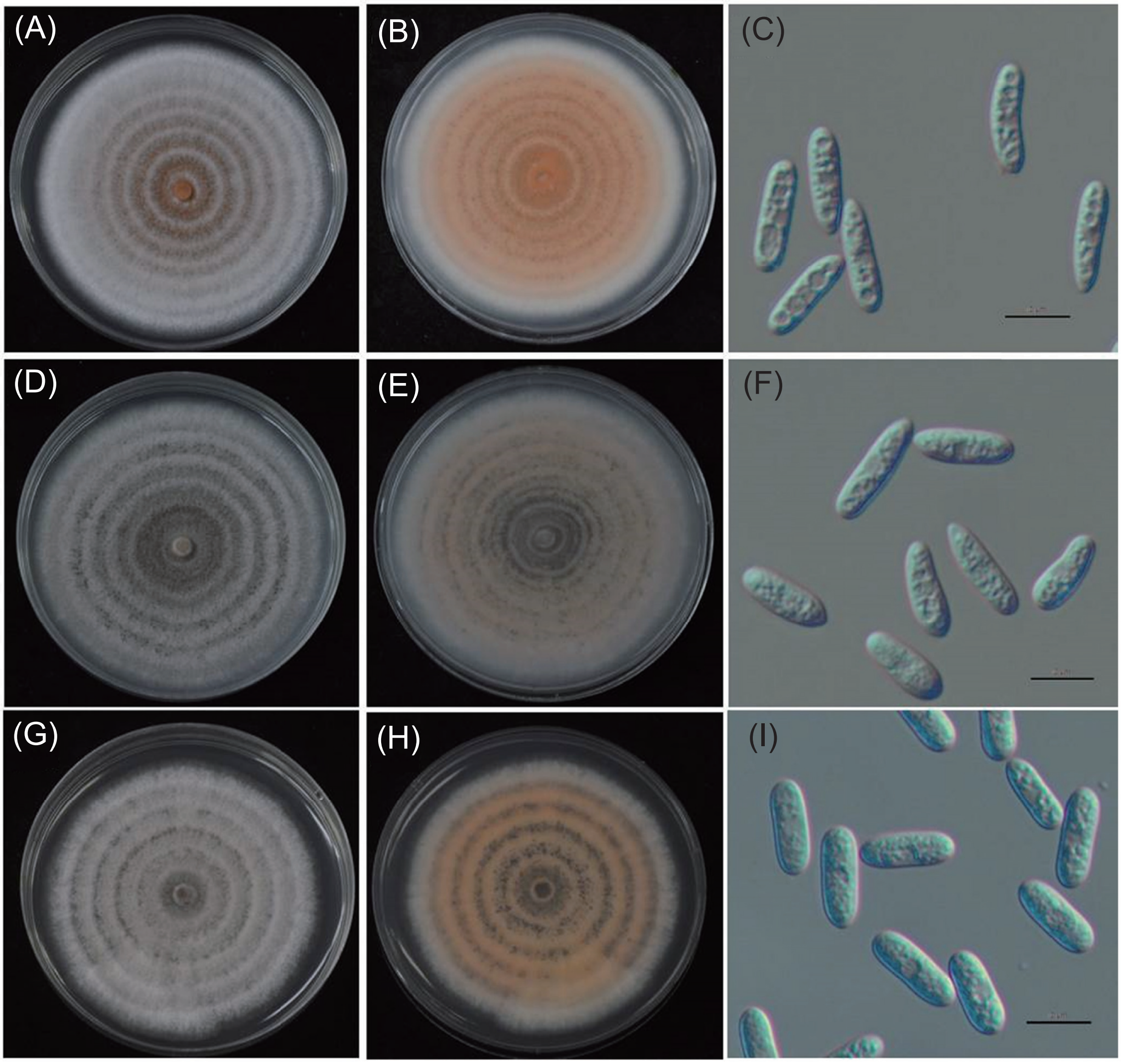


圖 2. *Colletotrichum siamense* C-997 菌株在 potato dextrose agar (PDA) 培養基之菌落 (A) 正面、(B) 反面以及 (C) 孢子形態；*C. siamense* C-1001 菌株在 PDA 培養基之菌落 (D) 正面、(E) 反面以及 (F) 孢子形態；*C. siamense* C-1133 菌株在 PDA 培養基之菌落 (G) 正面、(H) 反面以及 (I) 孢子形態。標尺 = 10 μm.

Fig. 2. (A) The upper side and (B) lower side of *Colletotrichum siamense* isolate C-997 colony on potato dextrose agar (PDA) plate and (C) its spores; (D) the upper side and (E) lower side of *C. siamense* isolate C-1001 colony on PDA plate and (F) its spores; (G) the upper side and (H) lower side of *C. siamense* isolate C-1133 colony on PDA plate and (I) its spores. Bar = 10 μm.

而 40℃時菌絲則完全不生長。以 *C. siamense* C-997 菌株進行溫度對孢子發芽試驗 (表 2)，在 20–30℃溫度下，孢子於葉片上 12 h 可達到 85% 以上發芽率，發芽孢子產生附著器的比例皆超過 95%；而 35℃時孢子於 12 h 發芽率仍可達到 79.2%，但在此發芽率下，附著器產生比例僅有 27.5%，顯示高溫不利於附著器的產生。

藥劑對 *C. siamense* 之菌絲生長與孢子發芽的影響

本研究共測試 13 種目前推薦在炭疽病上之化學藥劑對 *C. siamense* 之菌絲生長及孢子發芽之影響，結果分別如表 3 與表 4 所示。以菌絲生長之抑制率而言，在 1 mg L^{-1} 有效濃

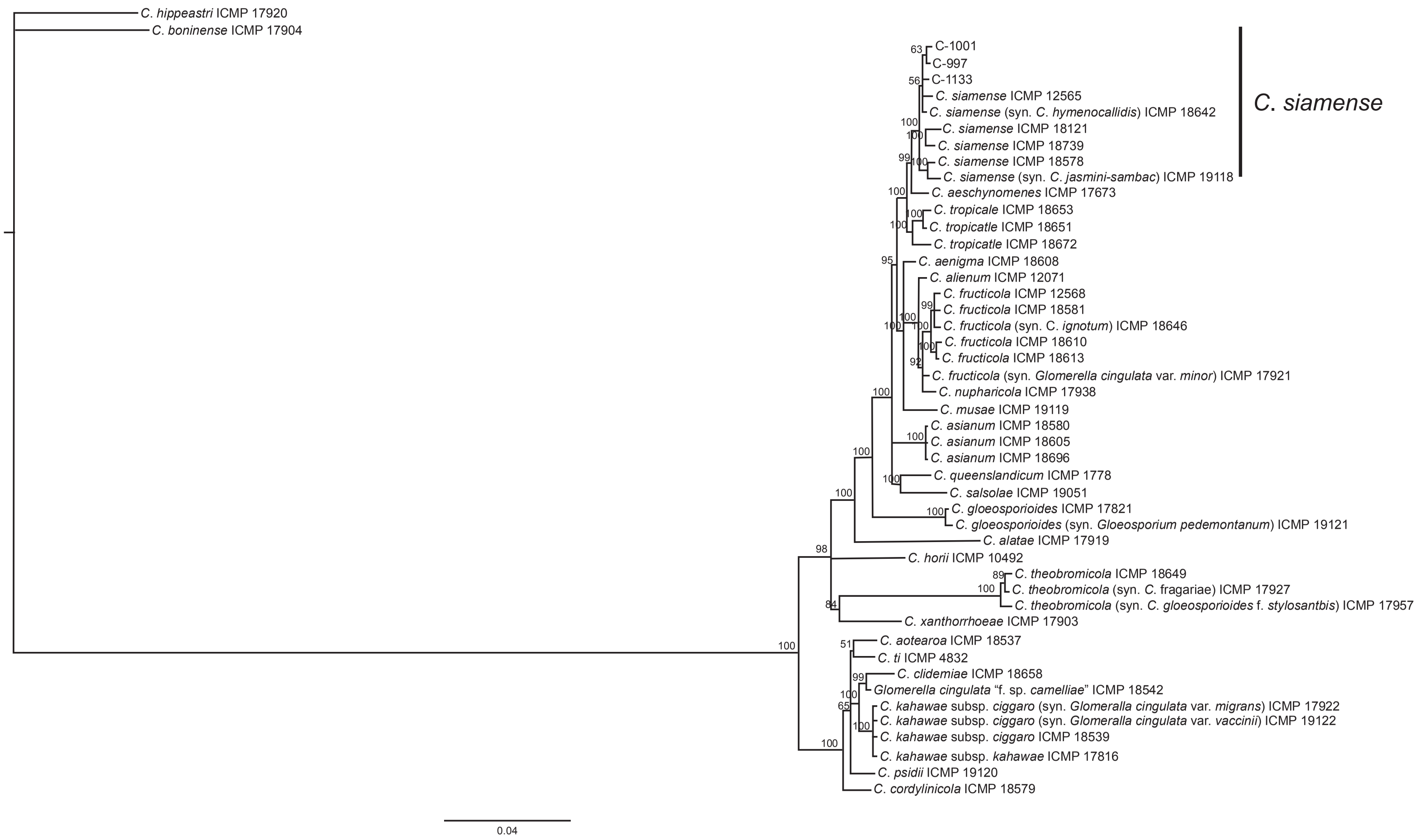


圖 3. 利用 Bayesian inference 演算法分析 actin (ACT)、calmodulin (CAL)、chitin synthase (CHS) 及 glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)，以進行 *Colletotrichum gloeosporioides* complex 與 *Colletotrichum siamense* C-997、C-1001 及 C-1133 菌株類緣演化樹之建構。

Fig. 3. A phylogenetic tree of *Colletotrichum gloeosporioides* complex and *Colletotrichum siamense* isolates C-997, C-1001 and C-1133 were constructed based on actin (ACT), calmodulin (CAL), chitin synthase (CHS) and glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes.

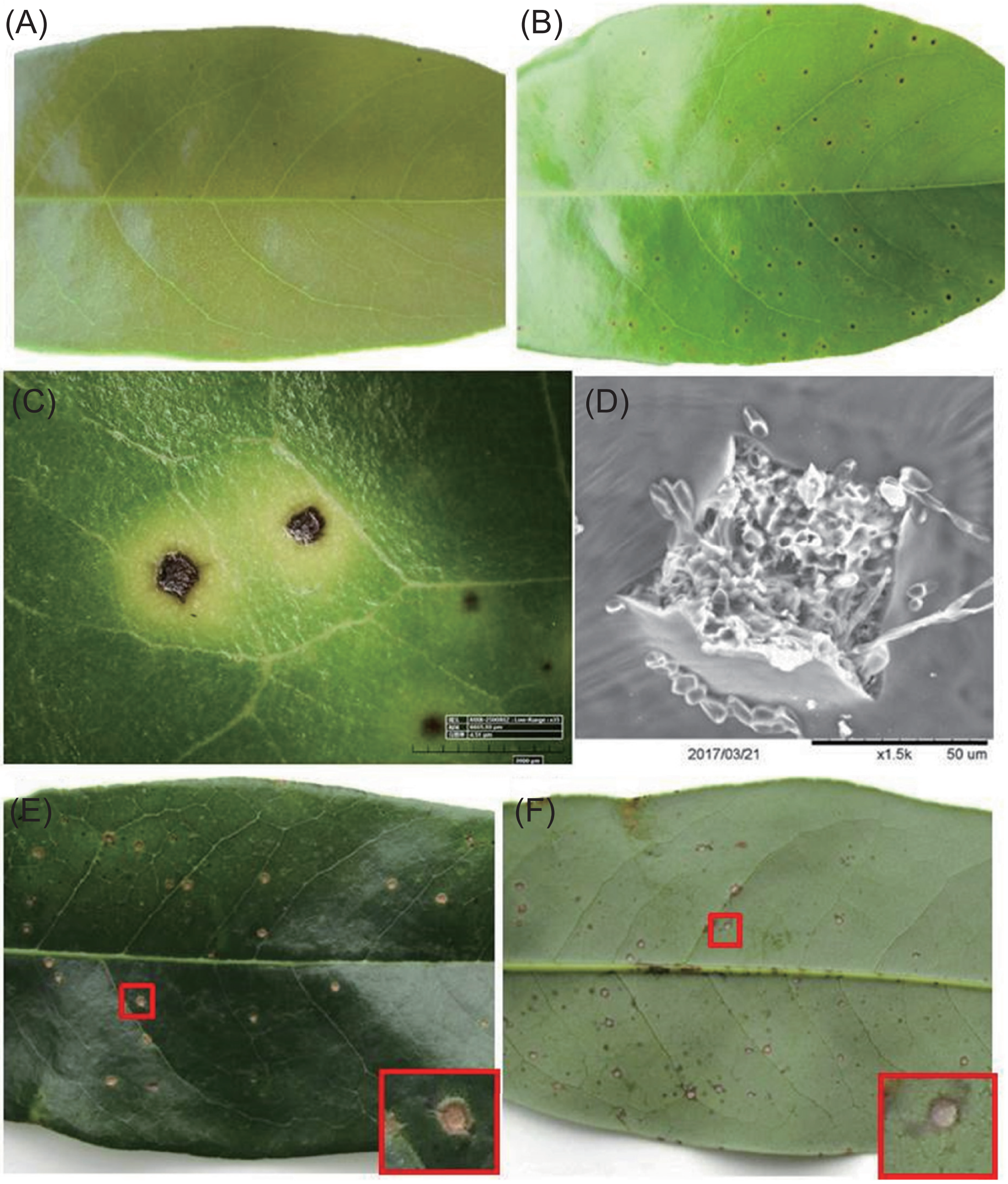


圖 4.　*Colletotrichum siamense* C-1001 菌株孢子懸浮液噴霧接種於荔枝「台農 7 號」嫩梢後 (A) 7 d 及 (B) 21 d 時發病情形，接種後 30 d (C) 病斑近觀及 (D) 掃描式電子顯微鏡拍攝之產孢構造，以及以 *C. siamense* C-1133 菌株接種後 50 d 葉片 (E) 正面及 (F) 反面。

Fig. 4.　The pepper spot symptom on lychee ‘TN7’ leaves (A) 7 d and (B) 21 d post *Colletotrichum siamense* isolate C-1001 inoculation and (C) a detailed appearance of the spot and (D) sporulation structure of the pathogen under scanning electron microscope 30 d post inoculation. The pepper spot symptom on (E) upper and (F) lower surface of lychee ‘TN7’ leaf 50 d post *C. siamense* isolate C-1133 inoculation.

度藥劑作用下，除了克熱淨對兩測試菌株之生長抑制率可達 70% 以上之外，其餘藥劑對菌絲生長抑制之效果均不佳。當藥劑有效濃度為 10 mg L-1 時，腐絕快得寧及甲基多保淨抑制率可達 80% 以上，得克利對 C-997 抑制率83.9%，克熱淨對 C-1001 的抑制率 82.4%，效果較佳。在 100 mg L-1 作用濃度下，則腐絕快得寧、甲基多保淨、得克利對兩菌株有 90% 以上抑制率，克熱淨對 C-1001 抑制率達 100%，待克利對 C-997 亦有 94.0% 之抑制率。就藥劑對孢子發芽之影響而言，以 *C. siamense* C-997 菌株進行試驗，在 1 mg L-1 有效藥劑濃度處理下，腐絕快得寧、腈硫醌及百克敏具有 100% 抑制孢子發芽之效果，當濃度提升至 10 mg L-1 有效濃度作用下時，則除了腐絕快得寧、腈硫醌及百克敏外，亞托待克利、得克利亦有 90% 以上之孢子發芽抑制率，而鋅錳乃浦的發芽抑制率則為 88.1%。當藥劑濃度高達 100 mg L-1 有效濃度時，腐絕快得寧、腈硫醌、百克敏、亞托待克利、得克利、鋅錳乃浦及滅特座對孢子發芽的抑制率均為 100%，賽普護汰寧則有 88% 的孢子發芽抑制率。

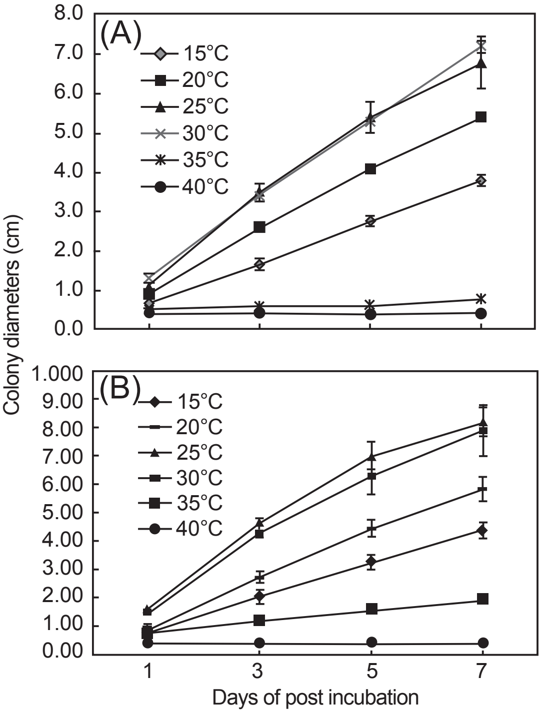


圖 5. 溫度對 (A) *Colletotrichum siamense* C-997 及 (B) C-1001 菌株菌絲生長之影響。

Fig. 5. Mycelial growth of (A) *Colletotrichum siamense* isolates C-997 and (B) C-1001 under different temperatures.

討論

本文為國內首篇詳細介紹由 *C. siamense* 引起之荔枝葉部針點病之報告，報導該病原菌形態特性與類緣關係、病原菌生長溫度及有效藥劑篩選。綜觀國內外 *Colletotrichum* spp. 引起荔枝病害相關研究，該屬病原菌可在荔枝上造成不同外觀之病徵，包括在葉片上造成針點斑，或在果實引起密集針點斑、小塊黑斑以及黑褐色邊緣不明顯之大形圓斑，偶爾造成蒂腐，也會於採收後果實上造成褐斑 (Coates *et al*. 2005)。以往國內外皆認為此類炭疽病是由

表 2. *Colletotrichum siamense* C-997 菌株於不同溫度下在荔枝葉片上之孢子發芽率與附著器產生率。

Table 2. Spore germination and appressoria formation rate of *Colletotrichum siamense* isolate C-997 on leaf tissue under different temperatures.

	Temperature (℃)							
	20		25		30		35	
Time	Spore germination (%)[z]	Appressoria formation (%)[y]	Spore germination (%)	Appressoria formation (%)	Spore germination (%)	Appressoria formation (%)	Spore germination (%)	Appressoria formation (%)
4 h	15.8	98.5	59.2	99.2	69.6	99.2	5.0	25.6
6 h	80.4	96.4	87.5	96.7	79.2	96.7	54.6	39.1
12 h	94.6	99.2	86.7	99.6	95.0	99.6	79.2	27.5

[z] Spore germination (%) = (numbers of germinated spores/total spores investigated) × 100%.
[y] Appressorial formation (%) = (numbers of germinated spores with appressoria/numbers of germinated spores) × 100%.

表 3. 不同殺菌劑對 *Colletotrichum siamense* C-997 與 C-1001 菌株菌絲生長之影響。

Table 3. Fungicide sensitivity of *Colletotrichum siamense* isolates C-997 and C-1001 rating by mycelial growth.

	Inhibition (%)[z]					
	C-997			C-1001		
Fungicide	1 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}	100 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}	100 mg L^{-1}
50.0% Trifloxystrobin WG[y]	29.0 e[x]	29.1 g	33.4 f	23.0 c	33.3 d	23.9 e
62.5% Cyprodinil + fludioxonil WG	44.4 c	44.9 f	64.9 e	43.7 b	53.7 c	73.8 c
80.0% Metiram WG	0.0 h	0.0 j	2.9 h	1.5 de	0.0 e	1.8 g
40.0% Iminoctadine triacetate WP	72.4 a	79.4 c	86.1 c	74.3 a	79.3 a	100.0 a
53.0% Thiabendazole + oxine-copper WP	1.1 h	91.9 a	95.4 ab	0.0 e	82.4 a	93.7 a
70.0% Thiophanate–methyl WP	8.4 g	87.0 ab	99.1 ab	26.9 c	81.3 a	100.0 a
70.0% Propineb WP	0.0 h	0.0 j	4.0 h	2.6 de	0.0 e	1.5 g
23.6% Pyraclostrobin EC	38.3 d	51.2 e	76.4 d	39.7 b	57.6 c	73.3 c
25.9% Tebuconazole EW	46.9 c	83.9 bc	100.0 a	40.0 b	72.4 b	99.8 a
25.0% Azoxystrobin SC	22.1 f	30.7 g	32.8 f	29.2 c	27.9 d	33.1 d
24.9% Difenoconazole SC	50.2 b	70.4 d	94.0 b	41.5 b	73.4 b	81.5 b
40.0% Chlorothalonil SC	0.0 h	15.9 h	34.1 f	8.9 d	29.5 d	36.3 d
42.2% Dithianon SC	0.8 h	9.9 i	19.8 g	0.0 e	0.0 e	12.0 f
LSD (P = 0.05)	2.7	5.7	5.3	7.7	5.8	6.4

[z] Inhibition (%) = [(Diameter of mycelial growth on PDA without fungicide – diameter of mycelial growth on PDA with fungicides)/ diameter of mycelial growth on PDA without fungicide] × 100%.
[y] WG: water dispersible granules; WP: wettable powders; EC: emulsifiable concentrate; EW: emulsion, oil in water; SC: suspension concentrate.
[x] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 4. 殺菌劑抑制 *Colletotrichum siamense* C-997 菌株孢子發芽之效果。

Table 4. Fungicide inhibition ability on spore germination of *Colletotrichum siamense* isolate C-997.

	Spore germination inhibition (%)[z]		
Fungicide	1 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}	100 mg L^{-1}
62.5% Cyprodinil + fludioxonil WG[y]	52.5 b[x]	72.7 c	88.0 b
40.0% Iminoctadine triacetate WP	8.4 f	32.2 e	53.0 d
53.0% Thiabendazole + oxine-copper WP	100.0 a	100.0 a	100.0 a
25.0% Azoxystrobin SC	15.3 def	17.0 f	15.3 f
42.2% Dithianon SC	100.0 a	100.0 a	100.0 a
32.5% Azoxystrobin + difenoconazole SC	18.8 de	100.0 a	100.0 a
50.0% Fluopyram + trifloxystrobin SC	9.5 ef	18.0 f	23.5 e
70.0% Thiophanate–methyl WP	45.8 bc	46.3 d	49.7 d
23.6% Pyraclostrobin EC	100.0 a	100.0 a	100.0 a
25.9% Tebuconazole EW	37.9 c	92.7 ab	100.0 a
34.5% Carbendazim + hexaconazole WP	46.9 bc	54.2 d	53.1 d
80.0% Mancozeb WP	23.2 d	88.1 b	100.0 a
23.7% Iprodione SC	37.3 c	76.8 c	74.0 c
9.0% Metconazole EC	15.3 def	48.6 d	100.0 a

[z] Spore germination inhibition (%) = (numbers of ungerminated spores/numbers of total spores investigated) × 100%.
[y] WG: water dispersible granules; WP: wettable powders; SC: suspension concentrate; EC: emulsifiable concentrate; EW: emulsion, oil in water.
[x] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

*C. gloeosporioides*或是*C. acutatum*所引起 (Ann *et al*. 2004; Anderson & Coates 2009)，然而隨著炭疽病菌多基因類緣分析方法發展，越來越多的證據顯示 *Colletotrichum gloeosporioides sensu stricto* 並非真正作物上常見的病原菌 (Phoulivong *et al*. 2010)。Ni *et al*. (2017) 首次指出在台灣發生之荔枝葉片針點病由 *C. siamense* 所造成，本篇則進一步針對此引起荔枝針點病之病原菌，進行外觀形態、生長溫度條件及藥劑感受性試驗。

目前對於荔枝針點病病原菌生活史仍未完全明瞭，本研究在其生活史中殘存、越冬的部分可增進一些瞭解。本研究調查炭疽病菌在葉片中殘存情形，發現炭疽病菌在葉片內殘存達 9 個月的時間後仍具有活性，且本菌在 15℃時菌絲仍可生長。而以荔枝產區高雄、台南、嘉義、台中等地為例，月均溫最低之 12 月都有 16℃以上，顯示炭疽病菌在此氣候條件下仍可越冬殘存。另外，經由溫度試驗發現，本菌菌絲生長的最佳溫度為 25–30℃，且孢子在 20–30℃間皆可萌芽並產生附著器 (appresorium)。由前述事實可推測本菌可殘存於枯葉之病斑上越冬，於來春氣溫較高時產生初次感染源，並於適當環境條件下進行傳播及侵染。

在藥劑施用的部分，由試驗結果可知，對菌絲生長及孢子發芽有抑制效果的藥劑種類不盡相同，在使用上應注意作用機制及施用時機的問題。對菌絲生長抑制效果最佳的藥劑為腐絕快得寧及甲基多保淨，次佳者為克熱淨及得克利；抑制孢子發芽的藥劑，則以腐絕快得寧、百克敏、腈硫醌效果最佳，亞托待克利、得克利為次佳者。綜合而論，對孢子發芽與菌絲生長都有良好抑制效果者為腐絕快得寧，其次為得克利。在藥劑選用上，腐絕與甲基多保淨作用機制相同，得克利、待克利作用機制相同，亞托敏、百克敏作用機制相同，輪用藥劑時應避免使用作用機制重複的藥劑，減少不必要的浪費。此外，百克敏、腈硫醌對孢子發芽有良好抑制效果，對於菌絲生長卻沒有明顯抑制效果，在田間施用時應注意其使用時機，在病害發展及傳播初期施用有良好抑制效果，對於孢子已萌芽且入侵植物組織的感染狀態則可能效果有限。

本研究中，腐絕快得寧對菌絲生長與孢子發芽皆有良好抑制效果，然而在田間使用上必須注意發生抗藥性的問題。腐絕快得寧為混合型的藥劑，其中腐絕的成分，與甲基多保淨的作用機制相同，皆為影響有絲分裂微管蛋白 (β-tubulin) 聚合。由前人的報導已知 *Colletotrichum* spp. 會對腐絕或其他苯併咪唑類 (benzimidazoles) 的農藥產生抗藥性，且其抗藥性源自於 *Colletotrichum* spp. 在微管蛋白上第 198 個胺基酸的位置，由原本的麩胺酸 (glutamic acid) 轉為丙胺酸 (alanine)，或是第 200 個胺基酸的位置由原本的苯丙胺酸 (phenylalanine) 轉為酪胺酸 (tyrosine) (Chung *et al*. 2010; Torres-Calzada *et al*. 2015)。在台灣，部分由台南市楠西區荔枝上分離得到的 *Colletotrichum* spp. 在微管蛋白第 198 個胺基酸的位置偵測到丙胺酸抗藥性基因突變，同時菌株對甲基多保淨及腐絕快得寧藥劑敏感性皆已大幅下降，暗示交叉抗藥性可能已經發生 (未發表資料)。由以上資料及結果，在台灣的荔枝上施用腐絕及甲基多保淨防治炭疽病時，為降低或延緩抗藥性的產生，應降低苯併咪唑類藥劑使用頻度，或謹慎施用。

荔枝葉片針點病目前在台灣各處果園發生並不嚴重，如能採行適當防治策略，則可完善控制。在田間衛生方面，因病原菌可殘存於田間枯葉而成為來年初次感染源，應進行清園以降低田間病原菌數量，此外適當修剪枝條以促進通風亦有助於降低病害發生機率。在藥劑施用上，除了注意抗藥性發生和輪用不同作用機制的藥劑外，也要注意藥劑施用時機。炭疽病菌具有潛伏感染特性，且可能在花期入侵，並在結果後造成病徵，此現象已在其他作物上有許多報導 (Binyamini & Schiffmann-Nadel 1972; Lima *et al*. 2011)。本研究中，由於針點病可感染新葉及嫩梢，於荔枝新梢期觀察新葉發病狀況，或可略窺病原菌在田間族群變化，依葉片上針點病發生情形決定施藥次數與時機，及早進行防治。

本研究報導荔枝葉片針點病之外觀形態、生長適溫及藥劑敏感性等資料，可作為將來病害鑑定及防治時之參考。另一方面，*Colletotrichum* spp. 在荔枝上可造成不同病

徵，除針點外，亦造成黑斑、黑腐病徵 (Ann *et al*. 2004)，同時也會造成荔枝採後病害的發生 (Johnson *et al*. 2002)，降低其儲架壽命。隨著多基因分子類緣關係分析方法的發展，可衍生出許多值得探討的問題。例如，在荔枝上造成不同病徵的炭疽病菌，是否為同一親緣種；又或者造成荔枝針點病的炭疽病菌，除 *C. siamense* 之外，是否還有其他種類，若荔枝炭疽病菌可歸於不同的種類，又其發病生態、生長適溫及藥劑敏感性是否有所差異。前述問題皆可於將來進行進一步探討，除可得到荔枝炭疽病病原族群的組成與田間分布的資料之外，也有助於將來防治策略的擬定，並瞭解與掌握田間抗藥性發生的情形和演變。

誌謝

本研究承陳幸葵小姐、許淑麗小姐、楊麗子小姐、蔡佳達先生及賴素玉小姐協助試驗進行，特此誌謝。

引用文獻

Anderson, J. and L. Coates. 2009. Lychee. p.145–148. *in*: Diseases of Fruit Crops in Australia. (Cooke, T., D. Persley, and S. House, eds.) CSIRO Publ. Victoria, Australia. 288 pp.

Ann, P. J. and W. H. Ko. 1984. Blossom blight of litchi in Taiwan caused by *Peronophythora litchi*. Plant Dis. 68:826.

Ann, P. J., H. L. Lee, and T. C. Huang. 1999. Brown root rot of 10 species of fruit trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Dis. 83:746–750.

Ann, P. J., J. N. Tsai, I. T. Wang, and H. J. Young. 2004. Litchi fruit anthracnose and the cause of black skin. Plant Pathol. Bull. 13:299–308. (in Chinese with English abstract)

Binyamini, N. and M. Schiffmann-Nadel. 1972. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 62:592–594.

Carbone, I. and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553–556.

Chung, W. H., W. C. Chung, M. T. Peng, H. R. Yang, and J. W. Huang. 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. New Biotechnol. 27:17–24.

Coates, L., E. Zhou, and C. Sittigul. 2005. Diseases. p.261–272. *in*: Litchi and Longan: Botany, Production and Uses. (Menzel, C. M. and G. K. Waite, eds.) CABI Publ. Wallingford, UK. 336 pp.

Cooke, A. W. and L. M. Coates. 2002. Pepper spot: A preharvest disease of lychee caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Australas. Plant Pathol. 31:303–304.

Drew, H. and J. Drew. 2001. Lychee Pepper Spot in Australia (Its Impact And Control). RIRDC Publi. Barton, Australia. 28 pp.

Johnson, G. I., A. W. Cooke, and U. Sardsud. 2002. Postharvest disease control in lychee. Acta Hortic. 575:705–715.

Kao, C. W. and L. S. Leu. 1980. Sporangium germination of *Peronophythora litchii*, the causal organism of litchi downy blight. Mycologia 72:737–748.

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948.

Lima, W. G., M. B. Spósito, L. Amorim, F. P. Gonçalves, and P. A. M. de Filho. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus postbloom fruit drop. Eur. J. Plant Pathol. 131:157–165.

Ni, H. F., C. W. Huang, C. J. Wu, H. R. Yang, C. Y. Lin, J. Y. Chang, and J. W. Chang. 2017. First report of pepper spot disease of lychee caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. J. Plant Pathol. 99:808.

Phoulivong, S., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, K. Abdelsalam, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal Divers. 44:33–43.

Rambaut, A. and A. J. Drummond. 2007. Tracer v. 1.4. http://beast.community/Tracer (visit on 08/20/2018)

Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539–542.

Schoeman, M. H. and B. Q. Manicom. 2000. Report on the epidemiology of pepper spot on Hass avocado. SAAGA Yearbook 23:95–97.

Templeton, M. D., E. H. A. Rikkerink, S. L. Solon, and R. N. Crowhurst. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the

plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122:225–230.

Torres-Calzada, C., R. Tapia-Tussell, I. Higuera-Ciapara, R. Martin-Mex, A. Nexticapan-Garcez, and D. Perez-Brito. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. Plant Dis. 99:1590–1595.

Tsai, H. L. 2005. Development of techniques for detection of latent infection and molecular identification of mango anthracnose fungi. Master Thesis, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 92 pp. (in Chinese with English abstract)

Tsai, J. N. and W. H. Hsieh. 1998. Occurrence of litchi sour rot and characteristics of the pathogens *Geotrichum candidum* and *G. ludwigii*. Plant Pathol. Bull. 7:10–18. (in Chinese with English abstract)

Tzean, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 311 pp. (in Chinese)

Vaidya, G., D. J. Lohman, and R. Meier. 2011. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics 27:171–180.

Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud. Mycol. 73:115–180.

Willingham, S. L., A. W. Cooke, L. M. Coates, and K. G. Pegg. 2000. Pepper spot: A new preharvest *Colletotrichum* disease of avocado cv. Hass. Australas. Plant Pathol. 29:151.

Yang, H. C. 1990. Plant anthracnose caused by *Colletotrichum* species in Taiwan. Ph.D. Dissertation, Faculty of Agriculture, Hokkaido University. Hokkaido, Japan. 190 pp.

Physiological Characteristics, Pathogenicity and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum siamense* Causing Lychee Pepper Spot Disease

Chao-Jung Wu[1], Chiao-Wen Huang[2], Jer-Way Chang[3], and Hui-Fang Ni[4,*]

Abstract

Wu, C. J., C. W. Huang, J. W. Chang, and H. F. Ni. 2020. Physiological characteristics, pathogenicity and fungicide sensitivity of *Colletotrichum siamense* causing lychee pepper spot disease. J. Taiwan Agric. Res. 69(1):11–24.

The causal agent of lychee pepper spot disease is *Colletotrichum siamense*. The symptom shows black needle-like spots on leaf, fruit, petiole and pedicle. In this study, many isolates of *Colletotrichum* spp. were isolated from needle-like spots on lychee 'Gue Wei' and 'No Mi Ci' and all of them were identified as *C. siamense* based on morphology and molecular phylogenetic analysis. In our previous study, the pathogenicity of *C. siamense* on lychee has been validated on lychee 'No Mi Ci'. In this study, pathogenicity test was conducted on lychee 'TN 7' to confirm that the pathogen causes symptoms on other variety in addition to 'No Mi Ci'. The temperature effect on *C. siamense* mycelial growth and spore germination was investigated. It was found that the optimal temperature for mycelial growth was 25−30℃, and mycelia growth of *C. siamense* kept viable under 15℃. In addition, spores germinated and produced appressoria on lychee leaves under 20–30℃. The result of fungicide sensitivity test indicated that thiabendazole + oxine-copper and thiophanate–methyl are the most suppressive on mycelial growth of *C. siamense*, followed by iminoctadine triacetate and tebuconazole. In addition, thiabendazole + oxine-copper, dithianon and pyraclostrobin had best suppression on spore germination, followed by azoxystrobin + difenoconazole and tebuconazole. The results of this study provide information for fungicide selection and control strategy on lychee pepper spot disease in the field.

Key words: Lychee, Pepper spot disease, Fungicide sensitivity.

Received: June 3, 2019; Accepted: September 22, 2019.

* Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

1 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

3 Research Fellow and Head, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

4 Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):25–45 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0003

研究報告

無人飛行載具之航拍影像應用於水稻倒伏災損判釋

周巧盈[1]　巫思揚[2]　陳琦玲[3,*]

摘要

周巧盈、巫思揚、陳琦玲。2020。無人飛行載具之航拍影像應用於水稻倒伏災損判釋。台灣農業研究 69(1):25–45。

無人載具 (unmanned aerial vehicle; UAV) 航拍能提供大範圍且高解析度之多光譜或高光譜影像，包含：可見光 (red-green-blue; RGB)、近紅外光 (near-infrared; NIR) 與 3D 點雲等影像資訊。本研究透過光譜分類技術與數值地表模型 (digital surface model; DSM)，評估不同影像分類技術對於水稻倒伏災損判釋的準確度，以期提出具有快速、簡易及準確性高的影像災損判釋方法，提供農業災害勘查與鑑定之空間輔助工具。本研究應用 UAV 航拍影像，首先透過 UAV 專業影像處理軟體 Pix4D Mapper，產生 DSM 與正射影像，透接著依據影像監督分類、標準差植生指數 (normalized difference vegetation index; NDVI) 分類及 DSM 分類，針對 2017 年 6 月分連續超大豪雨對台中市霧峰地區水稻所造成之災損倒伏情形，進行水稻倒伏災損影像判釋技術之發展。結果顯示，UAV 航拍所得之可見光 RGB 正射影像，能清楚觀測水稻災損範圍與相對的災損情形，針對大範圍之災區勘災作業，本研究推薦應用影像監督分類技術進行災損判釋，其水稻災損倒伏率比對申請救助之災損率的正確率約為 92% (以符合農業天然災害救助辦法中倒伏率 20% 為評估基準需求)。另外，再輔以現地災損查核，以加強災損判釋的正確性。因此，本研究建議，現今農業災害的勘災與災損救助作業，應透過階層分工的概念，發揮各類技術的最大功效，運用最精簡的時間與人力，以提供最快速與最高品質的災損評估成果。

關鍵詞：農業災害、影像監督分類、數值地表模型、常態化差異植生指標、災損救助。

前言

水稻為台灣最重要的糧食作物，全台水稻面積 (274,705 ha) 占耕地面積的 34.6% (Agricultural and Food Agency 2017b)，透過遙測技術進行水稻田判釋，可節省大區域傳統現地勘查上所需之人力、時間及經費，並具有涵蓋面積廣泛與即時性高的特性。同時，在區域的監測上，能提供具有經濟性且高效率的調查方法 (Wang *et al*. 2007; Chang & Shen 2011)。

近年來，國內應用遙測技術在水稻的調查主要分為以下四類：第一類透過高解析度衛星影像與航空攝影照片進行水稻田坵塊的判釋 (Chen & Tseng 1999; Lei *et al*. 2006; Chen & Shih 2007; Lei *et al*. 2013; Wan *et al*. 2016)；第二類透過航測影像與衛星影像進行水稻產量的推估 (Shen *et al*. 2002; Wu *et al*. 2002; Chang *et al*. 2005; Chang *et al*. 2006; Yang & Chen 2007; Chang & Shen 2011)；第三類透過遙測影像多光譜與高光譜資訊進行水稻生長性狀的估測，例如：水稻葉面積指數 (Yang *et al*. 2008)、水稻田蒸發散量 (Chien *et al*. 2008)、氮營養狀態對水稻植株生長的影響 (Lee *et al*. 2011) 等；第四類，近年來受到無人機空拍技術的普及，利用於在災後進行即時之水稻災損航拍，透過

投稿日期：2019 年 5 月 14 日；接受日期：2019 年 10 月 22 日。
* 通訊作者：chiling@tari.gov.tw
[1] 行政院農業委員會農業試驗所農業化學組博士後研究。台灣 台中市。
[2] 行政院農業委員會農業試驗所農業化學組計畫助理。台灣 台中市。
[3] 行政院農業委員會農業試驗所農業化學組研究員。台灣 台中市。

航拍影像進行水稻倒伏災損範圍與程度之判釋 (Yang *et al*. 2017; Chou *et al*. 2018b)。

無人飛行載具 (unmanned aerial vehicle; UAV) 近年來的技術開發逐漸成熟，又因製作研發成本降低、飛航安全性提升，加上導航技術的自動化，使得 UAV 的應用性越來越普及。相較於飛機、直升機及衛星所拍攝的影像，UAV 航拍所獲得的影像具有機動性高、解析度高及不受雲層影響等優點。因此，當天然災害發生時，能快速的針對特定的範圍進行航拍任務 (Restas 2015; Chou *et al*. 2018b; de Oliveira Silva *et al*. 2019)。UAV 種類概可分為定翼型 (fixed wing) 與旋翼型 (rotary wing) 兩大類。定翼型無人載具的滯空時間與飛行高度相較於旋翼式的表現佳，能獲得的影像拍攝範圍較大，但在起降與飛行過程受限於地形。旋翼型無人載具有垂直起降、高載重量、適合在複雜地形飛行等優點，但耗電量較高，無法進行較長的空拍作業 (Remondino *et al*. 2011; Chou *et al*. 2018a)。無人載具透過搭載不同的影像感測器，能獲得多樣的遙測資訊。一般 UAV 搭載可見光相機，涵蓋光譜的範圍為紅光 (R)、綠光 (G)、藍光 (B) 波段。而在高階或開發型之 UAV 機種，可依據需求搭載多光譜、高光譜、熱影像鏡頭或合成孔徑雷達 (synthetic aperture radar; SAR) 與光達 (light detection and ranging; LiDAR) 等不同性質、不同等級之感測器 (Ezequiel *et al*. 2014; Yang *et al*. 2018; Maes & Steppe 2019)。

UAV 航拍影像能獲取高地面解析度 (ground sampling distance; GSD) 的影像，透過影像判釋技術，能提供災後勘災的應用、估算災損範圍及判釋作物災損程度，以加速災後復原並減少人力與物力的投入 (Restas 2015; Hsieh *et al*. 2018)。Puig *et al*. (2015) 針對蜀黍高粱作物 (sorghum crop) 受到鞘翅目金龜子科 (Coleoptera: Scarabaeidae) 的昆蟲危害，透過 UAV 航拍獲得高解析度 (1.5–2.0 cm) 的可見光影像，利用機器學習之非監督式影像判釋，探討影像分類 (image classification) 技術對於作物受害程度的辨識能力，藉此提高作物病蟲害監測與生物防制。Näsi *et al*. (2015) 針對蠹蟲 (*Ips typographus* L.) 對於雲杉 (*Picea abies* L. Karst.) 造成的危害，透過高解析度 (GSD~2.4 cm) 的 UAV 航拍影像 [可見光 (red-green-blue; RGB)]，進行單株雲杉是否遭受蠹蟲危害之判釋，同時透過高光譜影像 (500–900 nm、GSD~9.0 cm) 評估雲杉的健康情形，以進行即時的森林健康監測。Chou *et al*. (2018a) 應用 UAV 航拍影像所獲得之高解析度影像 (GSD 5.0 cm)，透過影像非監督分類 (像元式與物件導向式)、影像分割及數值地表模型，針對颱風造成香蕉果園之災損傾倒情形，比較不同判釋分類法對於香蕉災損傾倒比率之判釋能力，並提供災後應變與勘災的空間輔助圖資，以提高災後大範圍香蕉園即時勘災工作的效率與技術。另外，Vega *et al*. (2015) 利用 UAV 獲取多時期高解析度的多光譜影像 [R、G、B、近紅外光 (near-infrared; NIR)]，計算標準差植生指標 (normalized difference vegetation index; NDVI)，進行向日葵作物 (*Helianthus annuus*, L.) 之生長監測，包含單位面積收穫量、生物量與氮含量，藉此能針對生長狀況不佳的作物區域，進行適當的撫育措施，以提高精準農業之專區管理成效。另一方面，Al-Rawabdeh *et al*. (2016) 應用商用型 UAV 針對道路旁的山坡地進行坍方 (landslide) 範圍估測，透過高解析度 (GSD 2.0 cm) 的 UAV 可見光影像，與影像匹配像對中的特徵點，產製 3D 點雲 (3-dimensional point clouds)，能模擬出公分級的坡地坍方面積，提供現地監測與勘災製圖所需。

因此，本研究利用 UAV 航拍影像所取得的影像資訊，包括可見光 RGB、近紅外光 NIR 與 3D 點雲，以發展適用於水稻倒伏之判釋技術。透過光譜分類技術與數值地表模型 (digital surface model; DSM) 之高程模擬，評估不同技術的災損判釋準確度，提出具有快速、簡易及高準確性的水稻倒伏災損判釋方法。另一方面，應用本研究所建議的災損判釋技術，針對 2017 年 6 月初連續超大豪雨造成台中市霧峰區大規模的水稻倒伏災情，進行 UAV 航拍影像產製、水稻倒伏面積估算及地籍地號圖層套疊，以提供農損查報所需之空間輔助圖資。並與現地調查之災損核定資料比對，進行災損申請、災損核定及災損空拍判釋

三者間之相關性比較。最終，應用 UAV 航拍技術發展農業災害勘查與鑑定之空間輔助工具，以加速災後查報及救助之作業流程，提高勘災效率並節省人力與物力。

材料與方法

研究區域

台灣中部地區 (包含台中市、彰化縣、南投縣) 的水稻生產區面積 (78,789 ha) 占全國水稻種植面積的 28.7% (Agricultural and Food Agency 2017b)，年產量約 40 萬公噸，主要提供國內糧食自給所需。台中市霧峰區位於台中市南端，東半邊主要有火炎山脈及九九尖峰的山陵地，西半部主要為平原地帶，地勢平坦，烏溪支流貫穿其間形成三角洲地帶，水源充沛且土壤肥沃，因此孕育良田，主要的平原作物為水稻 (圖 1)。霧峰地區農耕地約 3,000 ha，平原多為水田，面積約 1,300 ha，多種植水稻，近半為香米；山坡地多為旱田，面積近 1,700 ha，多種植荔枝、龍眼、香蕉、鳳梨等果樹。目前霧峰區擁有全台最大的香米種植區，品質佳，曾榮獲全國十大經典好米的殊榮 (Wufeng District Office 2016)。

台灣位於歐亞大陸邊緣，介於大陸型與海洋型氣候交界，氣候多變。夏季受海洋氣團影響，多颱風豪雨；冬季受大陸氣團影響，則有寒流、季風；春夏之交，處於大陸氣團與海洋氣團勢均力敵之際，陰雨霏霏的梅雨為其特色。近年來，受到全球氣候變遷的影響，極端型天氣災害頻繁發生。台灣中部地區常受到颱風、梅雨季及西南氣流所帶來的連日豪雨侵害，造成當地水稻及其他作物在生長與收穫期受到嚴重的影響。其中，水稻生長期間常遭受不同天然災害影響，輕則生長發育遲緩，重則明顯歉收。天然災害中，多以梅雨季 (5–6 月)、西南氣流雲雨 (6–10 月) 及颱風 (5–11 月) 所帶來的連日豪雨與強風影響最大，常造成秧苗期的秧苗枯死或稻株流失而缺株，分蘗期的植株倒伏或腐爛乾枯而缺株，抽穗開花期與穀粒發育期則有水稻植株倒伏、穗上發芽或影響授粉造成白穗空殼等農損情形 (Taichung District Agricultural Research and Extension Station 2016)。

依據行政院農業委員會農糧署 2013–2017 年近 5 年來農作物災害損失統計資料 (Agriculture and Food Agency 2018)，台灣中部地區水稻的災損面積約 9,800 ha yr^{-1} (主要災情為 2015 年 8 月分蘇迪勒颱風所致，約 21,800 ha，其餘年分災損面積約 < 1,000 ha yr^{-1})，占水稻生產面積的 12%。政府為了減少農民受到農業災害所造成的損失，並協助災害復原所需的財務，由農業委員會於 1991 年頒布「農業天然災害救助辦法」(最新修正日期 2018/01/02)，提供受災農民得以申請現金救助及低利貸款，儘速恢復生產。因此，地方鄉鎮公所依據農民提出申請的災損農地，依法規需在 14 d 內完成現地災損查核，單一坵塊倒伏率 20% 以上，即被認定為災區，符合救助申請。台灣中部地區近 5 年來水稻受損約 16,300 Mg yr^{-1}，每年估計損失產值為 370,600 千元 (Agriculture and Food Agency 2018)。

本研究針對台中市霧峰區的水稻田，鄰近台中市大里區與烏日區的五福里 (圖 1)，遭受 2017 年 6 月 1–3 日連續超大豪雨之影響過後 (累積雨量 450.5 mm)，於 2017 年 6 月 8–9 日進行災後無人飛機航拍作業，獲取多光譜影像資訊，拍攝面積為 396 ha。此研究區域水稻種植面積約 230 ha，平均受災程度大於 20% (Agriculture and Food Agency 2017a)，符合農委會農作物天然災害救助標準，即啟動災害救助申請與災損查核作業。

研究流程

本研究首先利用 UAV 進行水稻田區受災後即時之航拍影像，獲取低空飛行且影像重疊度高的災後空拍影像。接著透過 UAV 專業影像處理軟體 Pix4D Mapper，進行航拍影像之幾何校正、地理校正及輻射校正，完成影像鑲嵌拼接，並產製 DSM 與正射影像 (orthophotograph)。接著依此成果進行水稻倒伏之災損判釋，主要透過影像分類之可見光光譜、NDVI 植生指標及 DSM 等 3 種，並以專業人工數位化之水稻倒伏為基準，進行此 3 種技術之水稻倒伏判釋準確度比較。最後，依據實際災損案例與取樣資料，完成影像判釋技術之實際應用與評估分析。研究流程如圖 2 所示。以

圖 1.　研究區域 (396 ha)。次研究區域 (左下角面積：58 ha)。

Fig. 1.　Study area (396 ha). The sub site (58 ha) on the left-down corner of the study area.

下就 UAV 航拍規格、影像前處理、3 種影像判釋技術原理、各技術之水稻倒伏判釋準確度之比較原則進行介紹，最後應用本研究評估所得之最佳災損判釋技術，針對 2017 年 6 月初豪雨造成台中市霧峰區的水稻倒伏災情，進行實例應用與評估。

UAV 航拍與影像前處理

本研究使用的 UAV 為 Phantom 3 Advanced, DJI 旋翼無人飛機 (重量 = 1.2 kg；軸距 = 350 mm；最大飛行時間 = 23 min；最大飛航速度 16 m s^{-1})，搭配內建相機 (1/2.3 英寸 CMOS；有效像素 1,240 萬；FOV 94° 20 mm；F/2.8 鏡

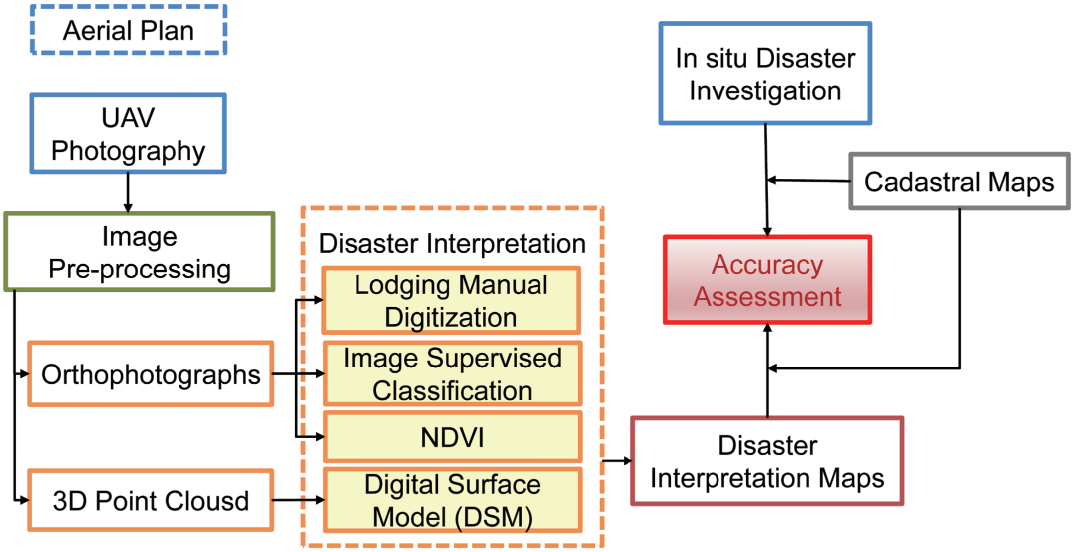


圖 2. 研究流程。

Fig. 2. Research process. UAV: unmanned aerial vehicle; NDVI: normalized difference vegetation index.

頭)，透過系統規劃的航拍路線與低空 (100 m) 穩定飛行，產生高度重疊的影像 (同一航線前後影像重疊率 70%；相鄰航線左右影像重疊率 60%)，以獲得高規格與高解析度之可見光 (R: 585–615 nm、G: 525–555 nm、B: 445–475 nm)，以及與相同型號 UAV 搭載修改之近紅外光相機航拍影像 (NIR: 795–825 nm)。影像鑲嵌拼接後之 GSD 約為 5 cm 網格大小的精度。航拍影像透過 Pix4D Mapper 影像處理軟體進行，其先進的影像匹配與自動化產製程序，能夠提供快速與高精度的空間影像，不需透過地面控制測量、空中三角測量與立體製圖等程序，即可取得正射影像與地形資訊，提供災後勘災所需之快速的空間資訊 (Ruiz *et al*. 2013; Hsu & Chang 2015)。因此，Pix4D Mapper 從原始影像讀取 GPS 紀錄、相機參數設定到空間資料產製，利用相對的自動匹配能力進行特徵點匹配，解算內、外方位參數，後經自動空中三角測量與平差，產生 3D 點雲資料，並進一步計算以獲得密集 3D 點雲與 DSM。再透過 DSM 進行正射影像糾正，以快速產製正射影像 (Tsai *et al*. 2013; Comba *et al*. 2018)。

本研究透過 Pix4D Mapper，除了能進行航拍影像前處理，包括影像鑲嵌拼接、DSM 及正射影像產出，同時能進行相機之率定校正、影像之幾何校正、地理校正與輻射校正 (Küng *et al*. 2011)。Pix4D Mapper 透過影像選取、替換及拼接改善，進行原始影像之正射鑲嵌編輯；透過加入地面控制點，進行幾何與地理校正；透過加入地面黑/白帆布之光譜值，進行輻射校正；透過率定參數 (calibration parameters) 進行相機率定，修正因相機在飛行過程中受到飛機馬達震動與環境中風速的影響。

水稻倒伏災損判釋技術

本研究依據多光譜 (R、G、B、NIR) 正射影像與 DSM，透過影像分類技術，依據地表光譜反射資訊、植生指標及高程資訊，應用數學與統計演算方法對 UAV 航拍影像進行水稻田區倒伏情形之判釋，並進一步評估不同技術的災損判釋準確度，以提出具有快速、簡易與準確性的水稻倒伏災損判釋工具。接下來將介紹所採用的三類影像分類技術。

影像監督分類 (supervised classification)

傳統的影像分類主要分為監督式 (supervised) 與非監督式 (unsupervised) 兩種。監督式分類利用地面真實資料進行光譜形式辨別，

需要先決定區分的作物類別，再依各類別選取訓練樣區 (training area)，並以各樣區之光譜統計值為影像資料分類的依據。而非監督分類利用數學運算檢查影像像元的光譜值，利用集群分析 (cluster analysis) 方式，依據事先給定的分類類別個數及多光譜波段的統計值，利用數值迭代的方式將影像分成指定個數的集群 (clusters) (Lillesand & Kiefer 2000; Arbiol *et al*. 2007)。非監督式分類的操作人員所需的訓練時間較短，透過給定所需分類的集群個數，即能單純利用統計方法進行影像分類，但分類結果需要進一步定義其類別意義，影像分類完全取決於像元之光譜特性，缺乏分類類別之空間分布的特性考量，且分類結果容易受到地貌的複雜性，影響分類的精確性。監督式分類主要由專業人員進行訓練樣區的選取，因此判釋的精確度相對較為穩定。另外，水稻多栽植於平原農田區域，其倒伏情形在空間上呈現連續的區塊性。因而，操作人員在選取水稻倒伏與非倒伏之訓練樣區時，能透過簡易的三角形或四邊形快速圈選代表樣區，同時不易受到地貌的複雜性而增加操作上的困難。因此，本研究將以監督式影像分類技術為水稻災損多光譜影像判釋的主要發展方向。

依據分類準則及程序的不同，監督式分類的演算法一般可分為最短距離平均法 (minimum-distance-to-mean classifier)、平行六面體法 (parallelepiped classifier) 與高斯最大概似法 (Gaussian maximum likelihood classifier)。其中，高斯最大概似法透過向量的方式計算第 i 個作物類別出現未知像元 X 之機率如式 (1) 所示：

$$P(X|i) = (2\pi)^{-\frac{d}{2}}|\Sigma_i|^{-\frac{1}{2}} \exp[-\frac{1}{2}(X-u_i)^T\Sigma_i^{-1}(X-u_i)] \quad (1)$$

d 為特徵數；u_i 為第 i 類的平均值向量；Σ_i 為第 i 類的共變異數矩陣；$P(X|i)$ 為某 X 由第 i 類而來的機率。

當 $X_1 > X$ 時，則 $P(X|i) > P(X|j)$，未知像元 X 分成 i 類；反之，若 $X > X_1$ 時，則 $P(X|j) > P(X|i)$，未知像元 X 判別為 j 類。因此，本研究採用此分類法估計各類別訓練樣區光譜反應形式的變方與相關係數，透過估算每一像元歸屬於不同類別之機率，並此像元歸類為最高發生機率的類別，依據此影像分類原則能夠獲得較高精度的結果 (Lillesand & Kiefer 2000)。本研究針對研究對象將影像區分為五大類：水稻 (rice)、水稻倒伏 (lodging)、水稻收穫 (harvest)、非水稻之植被 (vegetation) 與其他物件 (others，包含建物、水體、道路等)。透過 ESRI ArcGIS 地理資訊系統軟體 (Environmental System Research Institute 2019) Image Classification 工具中之 Training Sample Manager，進行 5 類訓練樣區的選取。樣區選取原則為具有代表性與完整性、每一個樣區至少包含 30 個像元且樣區需均勻分布在整個研究區域。樣區選取完成後，透過監督分類方法之 maximum likelihood classification，輸入運算所需之參數後，經過運算執行後，即可得到 5 種分類的影像檔。其中，能透過此成果進一步套疊 GIS 地籍圖框圖層，針對選定之地籍地號區域，判釋水稻與水稻倒伏之區域，並統計其水稻倒伏之面積比率值。

標準差植生指標 (NDVI)

NDVI 常用於偵測地表覆蓋物變遷，為綠色植物偵測最常使用之指標，因綠色植物生長越旺盛，吸收越多紅光 R，其反射之紅外光 NIR 越強，紅光 R 與紅外光 NIR 之差越大。但在地區間與季節間之差異下，會對影像比例法造成誤差，因此可利用常態差異 (normalization difference; ND) 調整因不同地區與季節影響之 NIR 與 R 之和，此法可降低誤差。NDVI 值介於 -1–1 之間，指數越大代表植物生長越旺盛 (Burgan & Hartford 1993)。NDVI 值為 NIR 與 R 光波段之差與兩者之和的比值：NDVI = (NIR – R)/(NIR + R)。

本研究透過 ESRI ArcGIS 軟體之 Spatial Analyst Tools 工具列中的 Map Algebra – Raster Calculator 工具，輸入所需的參數 (NIR 波段圖層、R 波段圖層) 與指標計算公式：NDVI = Float {[1.0 × (NIR – R)]/[1.0 × (NIR + R)]} ，即能得到研究區域之 NDVI 光譜影

像圖層。接著，進行 NDVI 數值的分類，透過 NDVI 數值的變化反應水稻倒伏情形。此處將 NDVI 光譜影像區分為五類：NDVI < 0.05、0.05 ≤ NDVI < 0.15、0.15 ≤ NDVI < 0.23、0.23 ≤ NDVI < 0.4、NDVI ≥ 0.4。本研究所依據之 NDVI 分類門檻值 (threshold) 為相對的數值，依據不同的研究區域與航拍影像所獲得的時間，而有相對不同的分類門檻值。原則上，NDVI 數值越小或負值，為非植生與水稻倒伏的機率越高；NDVI 數值越高，為植生與水稻的機率越高。因此，透過 NDVI 光譜值的分類，能進行水稻與水稻倒伏區域之判釋。同樣，將判釋成果進一步套疊 GIS 地籍圖框圖層，針對選定之地籍地號區域，進行水稻倒伏面積比率值之統計。

數值地表模型 (DSM)

本研究透過 UAV 航拍所獲得的高重疊度與高地面解析度之影像，應用 Pix4D Mapper 之高度自動匹配能力，透過相鄰影像之特徵點萃取及密集匹配，進行內、外方位參解算 (Jhan *et al*. 2011)，並依據自律光束法 (self-calibration bundle adjustment) 進行空中三角點平差後，進行密集 3D 點雲 (RayCloud) 重建 (Strecha *et al*. 2003; Tola *et al*. 2012)。Pix4D Mapper 產製 3D 點雲後，解算 DSM，並透過 DSM 進行正射糾正，產製正射影像 (Remondino 2013; Honkavaara *et al*. 2013)。因此，應用 Pix4D Mapper 處理 UAV 拍攝之影像，能快速且自動化產製高精度之 DSM。其中，可選定所欲產製之 DSM 格式 (包括：GeoTIFF、XYZ、LAS、LAZ 等) 與解析度。另外，若欲生成網格式 GeoTIFF 之 DSM，則可透過距離反比加權法 (inverse distance weighting; IDW) 或是三角測量法 (triangulation) 這兩種空間內插法 (spatial interpolation) 來處理。接著，選擇所欲使用的 DSM filters 方法，如 noise filter 與 surface smoothing，利用選取相鄰高程數值的中位數，來改善透過點雲所獲得之 DSM 的干擾與誤差之檔案格式。

本研究為針對水稻田區內之高程差異進行水稻倒伏之災損程度判釋，需進一步套疊 GIS 地籍圖框圖層，針對選定之地籍地號區域，進行各別田區內 DSM 之相對高程數值分類，以消除整區 DSM 的精準度與精確度問題。本研究透過 ESRI ArcGIS 軟體之 Symbology Classification 工具的分級統計面量圖 (Choropleth Map) 功能，依據 natural breaks (Jenks) 的分類原則，將選定之地籍區塊內的 DSM 概分為 5 大類，藉以強化單一坵塊內的相對高程差異，以進行水稻倒伏的災損判釋。其中，natural breaks (Jenks) 的分類原則為透過聚集分類 (cluster classification) 的方式，以最小化各分類群集與其平均值的差異，同時最大化各分類群集間的平均值。因此，本研究將相對 DSM 之 5 分類定義為：倒伏-矮、倒伏-高、半倒伏、直立-矮、直立-高，藉此區分水稻與水稻倒伏兩者間的相對高程差異，並進而估算水稻田區倒伏面積之比率值。

水稻倒伏判釋技術之準確度評估

針對研究區域透過隨機的方式，選擇一較小範圍的區塊 (圖 1 左下角之紅色方形區域)，約 58 ha 的研究區，進行水稻倒伏災損之人工數化 (digitization)、影像監督分類、NDVI 分類與 DSM 分類之建立。並於此區內，隨機選取 30 處以上具有倒伏情形之水稻田區 (地籍區塊) 為樣區，進行不同之水稻倒伏判釋技術的倒伏率面積估算之統計依據。本研究，透過統計軟體 R version 3.3.2，進行 Pearson 相關係數 (Pearson correlation coefficient) 之計算與 Student's T 檢定 (Student's *t*-test)，比較各水稻倒伏判釋技術與人工數化成果間的統計相關性，並進而歸納出具有理論基礎與實務應用價值之最佳災損影像判釋技術。

水稻倒伏判釋技術之實例應用與評估

依據上述水稻倒伏判釋技術之準確度評估所歸納得出的最佳技術，進行研究區域 (396 ha，圖 1) 之豪雨過後災損影像判釋之實例應用。此處，研究區域內共有 634 筆坵塊，此處隨機選取 67 筆 (~10%) 符合災損現金救助條件 (單一坵塊倒伏率 20% 以上) 的地籍坵塊，作為評估影像判釋技術之災損推估應用的統計分析樣本。本研究區域之災損救助申請與災損查核成果，由台中市政府霧峰區公所農業課所

彙整之統計資料提供。此災損統計資料包含申請救助之地號、土地面積、災損率、作物類別以及勘查核定之土地面積與災損率。本研究透過地籍圖之地段號為套疊索引 (merge key)，使用 ESRI ArcGIS 軟體進行災損統計資料套疊 GIS 地籍圖層，產生申請災損率與核定災損率之 GIS 圖層。並將此兩類災損率與影像災損判釋率進行比較，嘗試建立影像災損判釋率與災損救助申請、災損查核成果間之關聯性，以發展能提供農損查報所需之災損率推估值與空間輔助圖資。

結果與討論

數值高程模型 DSM 與正射影像

依據 UAV 航拍所獲得具有 GPS 點位 (經、緯度與高程)、鏡頭拍攝角度 (pitch、roll、yaw) 與拍攝時間紀錄的影像，利用 Pix4D Mapper 軟體自動抓取照片點位與鏡頭角度的功能，透過相鄰影像控制點 (key points) 與自動匹配點 (matching points) 的確認，進行影像地理校正、幾何校正與拼接。本研究首先針對次研究區域 (58 ha，圖 1 左下角)，透過 271 張 UAV 航拍影像 (圖 3A)，Pix4D Mapper 軟體平均從每張影像提取 8,092 個控制點、2,418 個匹配點 (圖 3B)，完成正射影像產製之控制匹配與率定程序。

首先完成密集 3D 點雲與地表紋理 (圖 3C) 的模擬成果，最終產生 DSM (圖 3D、圖 4) 與正射影像 (圖 5)。其中，平均空中三角測量誤差 (mean re-projection error) 為 0.17 pixel，透過相機校正參數 (R1, R2, R3) 進行初始焦距 (3.61 mm) 與最適化焦距 (4.05 mm) 之校正，兩者間之差小於 0.50 mm，因此影像扭曲的

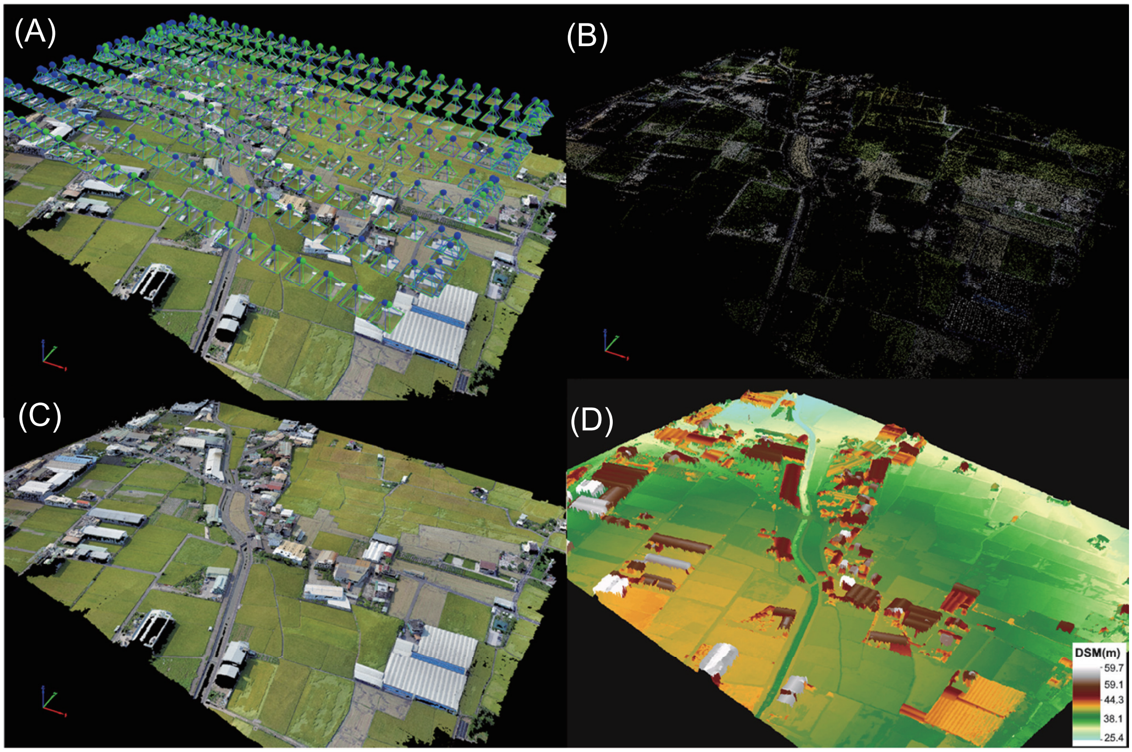


圖 3. UAV 航拍影像拼接與 3D 點雲模擬。(A) 航拍路線 (航拍點位與影像之相對位置示意圖)；(B) 匹配點分布 (具有地表紋理之顏色擷取)；(C) 密集 3D 點雲與地表紋理影像；(D) 數值高程模型。

Fig. 3. Mosaic image of unmanned aerial vehicle (UAV) photographs and 3-dimensional point clouds. (A) Aerial route with locations of flights and relative positions of UAV photographs. (B) Tie points with ground surface texture color. (C) Densified 3-dimensional point clouds and ground surface texture. (D) Digital surface model (DSM).

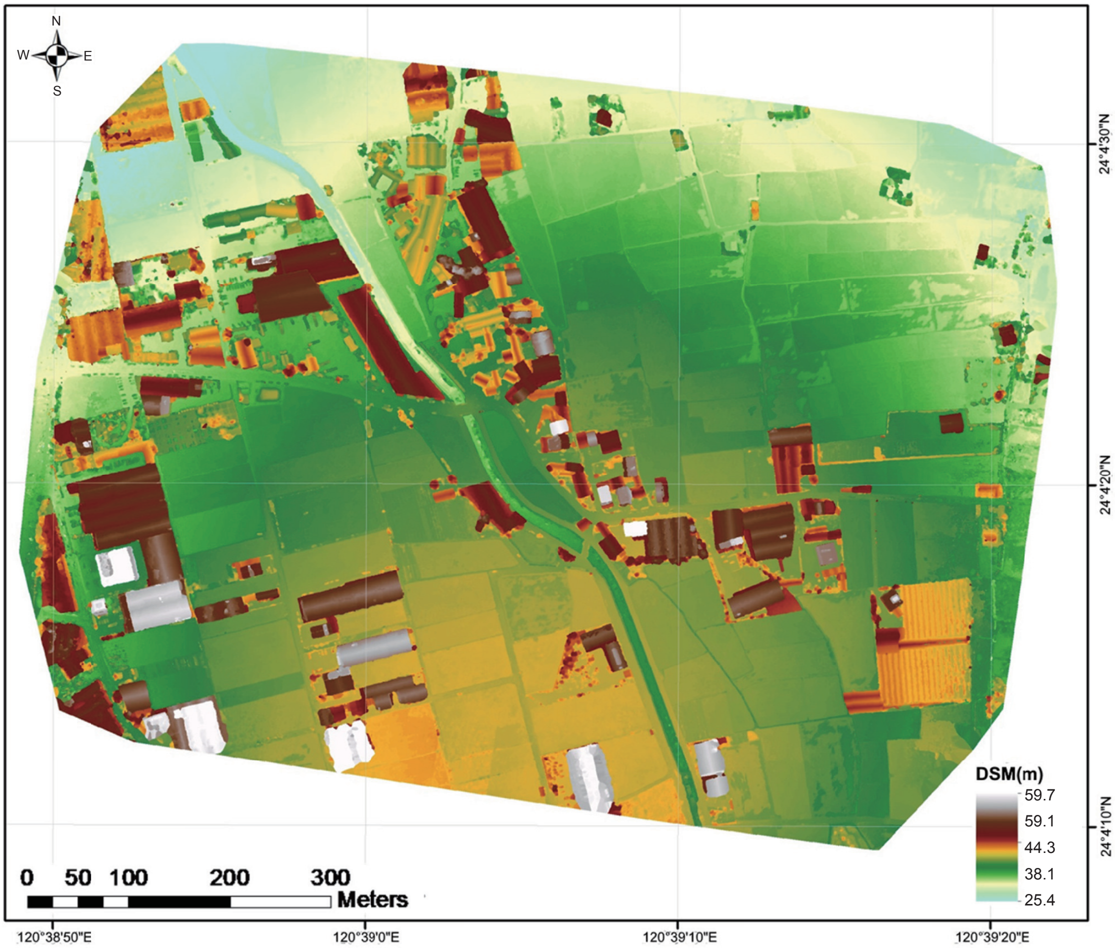


圖 4. 數值高程模型。

Fig. 4. Digital surface model (DSM).

現象得以透過鏡頭的畸變差加以校正。正射影像的 GSD 為 4.34 cm，DSM 的網格大小同樣為 4.34 cm，其高程精度 (21.70 cm) 為平面精度的 1/5 倍。另外，正射影像拼接誤差 (RMS Error: X : Y = 3.04% : 1.15%) 與 DSM 誤差 (RMS error of Z = 4.13%)，皆小於 < 5%。因此， 正射影像拼接與 DSM 模擬成果，在整體而言具有高度的正確性與可信度。

透過密集 3D 點雲套疊地表紋理 (圖 3C) 或是正射影像 (圖 5) 即能大致呈現地貌狀態，並初步進行水稻與水稻倒伏之判釋。水稻色澤深綠、紋理均質性較低、呈現毛毯狀；水稻倒伏之色澤淺綠偏黃、紋理均值性較高、呈現平滑面。因水稻與水稻倒伏兩者間的色澤與紋理差異大，而能清楚且直接地透過目視法，進行兩者之判釋。因此，本研究可利用影像光譜的特性，透過影像監督分類與光譜植生指標之計算，發展水稻災損倒伏之影像判釋技術。另外，雖然透過 DSM 模擬成果 (圖 3D、圖 4) 能呈現研究區域整體的相對高程差異分布，但針對本研究對象水稻田區內的高程模擬，因受到田區內的控制點 (68.4 pts ha^{-1}；整體平均值為 143.3 pts ha^{-1}) 與匹配點 (20.7 pts ha^{-1}；整體平均值為 42.8 pts ha^{-1}) 之生成密度相對較低 (圖 3B)，使得田區內水稻與水稻倒伏兩者間的高程差異，不易直接透過 DSM 高程數值進

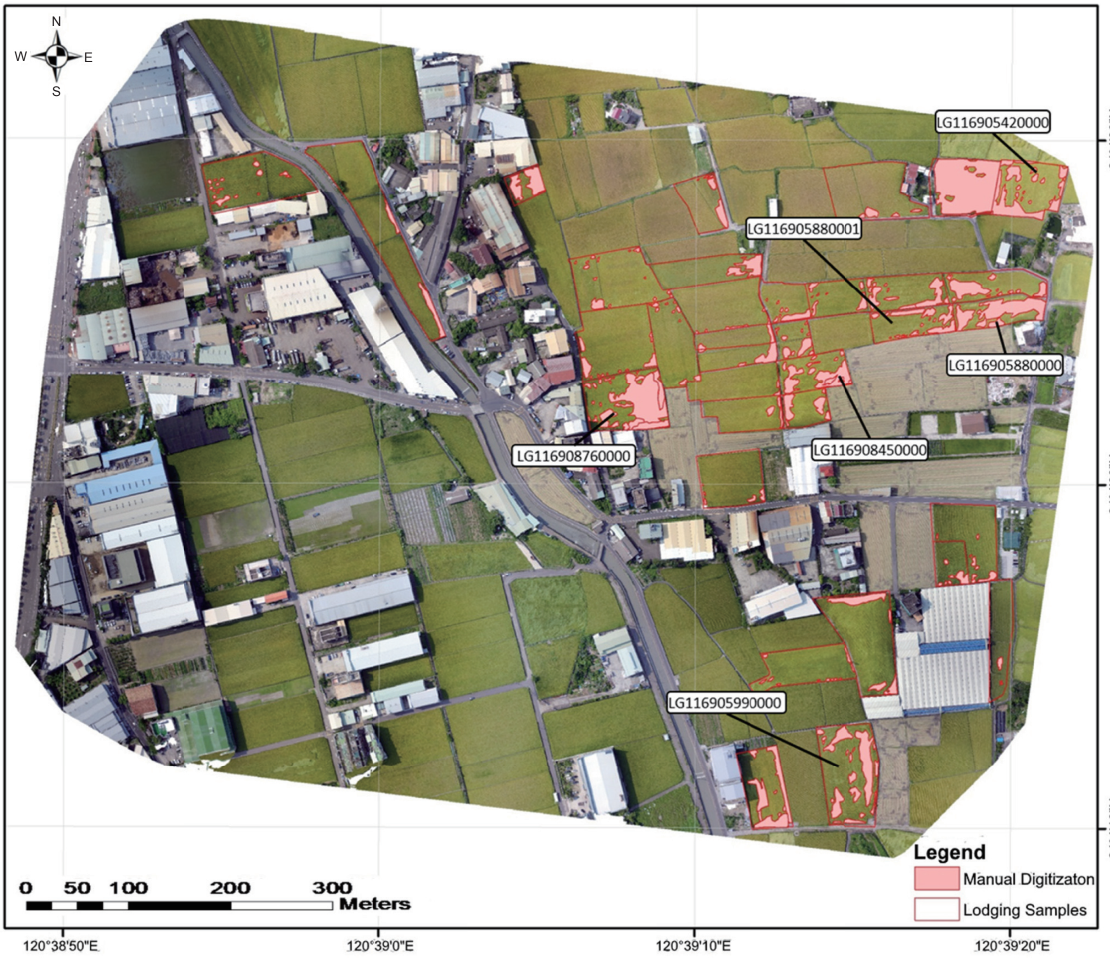


圖 5.　UAV 航拍正射影像套疊人工數化之水稻倒伏災損區域。

Fig. 5.　Unmanned aerial vehicle (UAV) orthophotograph overlapped with rice lodging area of manual digitalization.

行區分。因此，本研究在依據 DSM 進行水稻倒伏高程判釋時，需進一步針對田區內之相對 DSM 高程數值進行分類，以減少受到點雲密度不足所產生的影響。

UAV 航拍影像透過 Pix4D Mapper 能快速產生正射影像與 DSM，其品質取決於 3D 點雲 (包括控制點與匹配點) 的生成密度與分布均質性。高密度與分布均勻的 3D 點雲，除了受到 UAV 航拍前的路線規劃、航拍時的飛行穩定度、相機鏡頭的解析度與感光力等因素影響外，拍攝區域的地形變化程度與拍攝對象的複雜程度，都會對 3D 點雲的產生造成影響。一般來說，3D 點雲大多在明確可辨認的物件中生成，例如道路、建物、田埂邊界等。對於色澤與紋理相對均質的物件，就越不易在相鄰影像間產生匹配點，例如：森林、水稻、果園、草地、水體等。因此，在應用 UAV 進行水稻災損航拍與影像判釋時，可以透過低空且系統性的飛航路線規劃、使用高畫素高感光度的專業相機、選擇地勢平穩的區域進行拍攝，以減少地形起伏變化對 3D 點雲的密度與均質性造成影響。若需針對農作物與森林地進行航拍，則需瞭解 UAV 應用的特性與局限性。對於物件均質性與複雜性太高的對象，都不易獲得高品質的成果。

另外，為提升航拍影像的品質與產品的正

確性，需加強影像的輻射、幾何與地理校正等前處理。本研究初步只透過簡易的黑白帆布與 Pix4D Mapper 中的功能進行幅射校正；另外主要透過分布於交岔路口的 6 個地面控制點進行地理校正 (如圖 1 所示)。其中，地面控制點的布設原則為均勻分布於研究樣區、主要位於空曠的路面交岔口；另外，控制點的數量取決於精度需求與時間、成本上的考量，本研究初步選用 6 個控制點。未來將依據本研究的成果，針對控制點的數量與影像拼接校正度，進一步評估與討論。因此，影像光譜資訊與座標位置的準確性，除了須透過軟、硬體的升級、實地航拍前置工作的規劃與經驗的累積外，針對災後資訊取得的時效性與正確性，兩者間的權衡拿捏，也是應用 UAV 進行勘災重要的考量點。

水稻倒伏災損判釋之成果與比較

本研究透過高解析度 UAV 航拍影像，完成可見光影像之水稻倒伏監督分類與光譜植生指標 NDVI 分類成果如圖 6、圖 7 所示。圖 6 所呈現的水稻倒伏監督分類成果，能將田區坵塊 (包含：水稻-Rice、水稻倒伏-Lodging、水稻收穫-Harvest) 與非田區坵塊 (包含：非水稻之植被-Vegetation、建物與道路等其他物件-Others) 清楚區分。其中，田區坵塊中大部

圖 6. 影像監督分類之水稻倒伏判釋成果。

Fig. 6. Rice lodging discrimination from image supervised classification.

圖 7.　影像光譜 NDVI 分類之水稻倒伏判釋成果。

Fig. 7.　Rice lodging discrimination from image normalized difference vegetation index (NDVI) classification.

分為水稻-Rice 的分布，水稻倒伏-Lodging 多零散分布於水稻區塊內，呈現破碎化。本研究範圍的東北區 (圖 6)，有部分的水稻坵塊發生整區倒伏現象。另外，因研究時期為 6 月初，屬於一期水稻的採收期，因而有部分田區呈現水稻收穫-Harvest。因此，本研究透過影像監督分類技術，針對田區坵塊的 3 種水稻類型的判釋，能呈現初步的區分成果 (圖 6)。

圖 7 所呈現的影像光譜 NDVI 分類成果，能清晰地將田區坵塊與人工建物之輪廓勾勒出來，透過 NDVI (5 分類) 所呈現的地貌類別，相較於影像監督分類 (5 分類、圖 6) 所呈現的更為精細，尤其是針對單一人工建物的細部呈現。當 NDVI < 0.15，基本上屬於非植被或水稻倒伏之區域；NDVI > 0.23，基本上屬於植被區域。此處可發現，水稻之 NDVI 值相對小於其他植被的 NDVI 值，但不易清楚區分水稻與非水稻之植被；針對 0.15 ≤ NDVI < 0.23，除了屬於非植被狀態的人工建物與道路外，水稻收穫區與水稻倒伏區的 NDVI 值也落在此一區間。因此，應用影像光譜 NDVI 值進行水稻災損倒伏之判釋 (圖 7)，對於研究區域整體之水稻、水稻倒伏與人工建物等不同類型的物件，能清楚區分；但是，不易進行水稻與其他植被、水稻倒伏與水稻收穫、水稻倒伏與人工建物等上述兩兩類別之區分。所以，本研究需

進一步針對田區坵塊內之 NDVI 值，進行水稻與水稻倒伏區域之判釋，以減少水稻倒伏在全區整體判釋上所造成的誤差。

水稻倒伏區域之專業人工數化成果，透過圖 5 之粉紅色區塊 (紅色邊框) 呈現。本研究進一步選取 6 個樣本 (地號：LG116905880001、LG116905880000、LG116908450000、LG116908760000、LG116905990000 及 LG116905420000) 進行田區坵塊內之水稻倒伏災損判釋技術之視覺化比較，透過圖 8 能清楚呈現各影像分類技術於田區坵塊內之水稻與水稻倒伏間之光譜差異。圖 8 之第一欄首先透過正射影像，呈現高解析度可見光 UAV 航拍影像對於水稻與水稻倒伏兩者間的光譜差異。圖 8 之第二欄為專業人工數化，依據正射影像在田區坵塊中水稻與水稻倒伏的可見光光譜差異，將水稻倒伏區加以圈選，並依此作為比較各水稻倒伏災損判釋技術之準則。圖 8 之第三欄為影像監督分類成果 (image supervised classification)，田區坵塊中主要由水稻 (黃色)

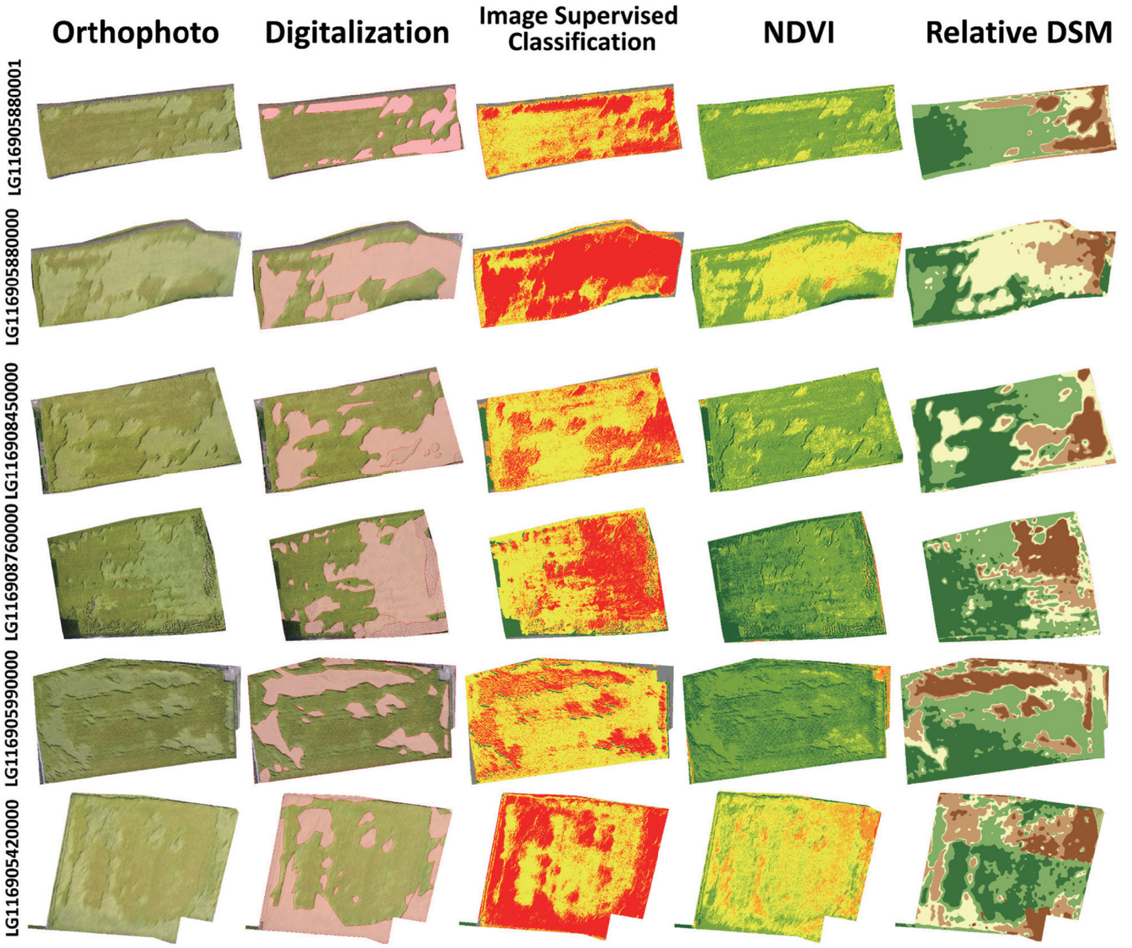


圖 8. 水稻倒伏災損判釋技術之成果比較 (Digitalization：粉紅色為人工判釋水稻倒伏區；Image Supervised Classification：圖例如圖 6 所示；NDVI：圖例如圖 7 所示；Relative DSM：深棕色為倒伏-矮、淺棕色為倒伏-高、淡黃色為半倒伏、淺綠色為直立-矮、深綠色為直立-高)。

Fig. 8. Comparisons of rice lodging discriminations from different technologies [Digitalization-pink region: lodging area; Image Supervised Classification: shown as Fig. 6; Normalized Difference Vegetation Index (NDVI): show as Fig. 7; Relative Digital Surface Model (DSM)-dark brown: lodging-short, light brown: lodging-tall, light yellow: lodging-moderate, light green: rice-short, and dark green: rice-tall].

與水稻倒伏 (紅色) 兩類為主。圖 8 第四欄為田區內 NDVI 分類成果，水稻倒伏主要由黃、橘、紅色呈現，水稻未倒伏主要由綠色系呈現。圖 8 第五欄為田區坵塊內之相對 DSM 分類成果，水稻倒伏主要由淡黃與橘色系呈現，水稻未倒伏主要由綠色系呈現。

依據圖 8 所呈現的水稻倒伏與非倒伏判釋成果，影像監督分類與相對 DSM 分類所判釋的水稻倒伏之區域與專業人工數化的區域較相近，其中相對 DSM 透過 5 個分類，能將不同倒伏程度加以細分。相對來說，NDVI 分類所呈現的水稻倒伏區域與專業人工數化及另外兩種判釋成果較有出入。圖號 LG116908450000 (第三列)、LG116908760000 (第四列) 及 LG116905990000 (第五列) 之水稻倒伏區域未被 NDVI 值所判釋，但卻將 LG116905420000 (第六列) 全區判釋為水稻倒伏。另外，依據本研究隨機選取的 33 塊樣區 (如圖 5 所示 -*Lodging Samples*)，其所進行的水稻倒伏判釋技術之統計評估，三種災損判釋技術之成果與專業人工數化之水稻倒伏災損率之統計相關比較如圖 9 所示。影像監督分類、相對 DSM 分類與 NDVI 分類等三種判釋技術與專業人工數化之水稻倒伏率之 Pearson 相關係數各為 0.92 (P = 0.05)、0.95 (P = 0.01) 及 0.24 (P = 0.52)，其中影像監督分類與相對 DSM 分類之水稻災損倒伏判釋與專業人工數化成果具有顯著的相關性 ($P \leq 0.05$)。因此，透過圖 8 視覺化的呈現與圖 9 統計分析比較結果得知，影像監督分類與相對 DSM 分類皆能提供具有代表性與高準確度的水稻災損判釋成果。

接著，進一步比較影像監督分類與相對 DSM 分類兩判釋技術的實務應用價值。影像監督分類需透過訓練樣區的選取，以進行整個研究區域之災損倒伏判釋分類。相對 DSM 分類需先產生整區的 DSM 後，再進一步針對各個研究坵塊範圍內之 DSM，進行 DSM 統計面量圖之分類。因此，在實務操作上，相對 DSM 分類技術需要較多的分析步驟與影像處理時間 (~120 min 50 ha^{-1})；相對來說，影像監督分類所需的分析步驟與時間較少 (~60 min 50 ha^{-1})，只需要分析者能對於研究區域的影像具有視覺上的判釋能力，完成訓練樣區的選取。透過上述之評估結果，本研究推薦應用影像監督分類技術進行水稻災損倒伏之判釋，其具備理論基礎與實務應用之價值。接下來將依據影像監督分類技術，針對研究區域全區約 396 ha 的範圍，評估其應用於水稻災損倒伏之判釋準確度。

水稻倒伏判釋技術之實例應用與評估

依據影像監督分類技術，針對研究區域之五分類，選取具有代表性與完整性之訓練樣區後，透過 ESRI ArcGIS 中 Image Classification 工具之 maximum likelihood classification 方法，執行影像監督分類之運算，成果如圖 10 所示。圖 10 呈現套疊 GIS 地籍圖之 UAV 航拍正射影像 (圖 10A) 與影像監督分類之水稻倒伏判釋成果 (圖 10B)，透過高解析度 UAV 正射攝影像所呈現之光譜、色澤與紋理等特性，能清晰且直接地呈現水稻倒伏災損情況，比對監督分類之水稻倒伏判釋成果，其能提供整個範圍之災損判釋的 GIS 評估依據，協助勘災人員掌握災損範圍與災損程度。透過影像監督分類之水稻倒伏判釋成果 (圖 10B)，水稻倒伏區域 (紅色) 主要發生在研究區域的中部、南部與西北部地區，東半部的水稻田主要為已收穫的田區 (橘色)，另外西部區域為直立水稻區 (黃色)，此兩區的災損情形不嚴重。

接著，於研究區內隨機選取 67 筆地籍坵塊 (倒伏率 20% 以上)，透過統計各坵塊內之水稻倒伏像元數與區域總像元數，即進行所選坵塊之水稻災損倒伏率之估算。影像監督判釋所估算之水稻災損倒伏率 (disaster rate of estimated by image interpretation) 分別與申請救助之災損率 (disaster rate of compensation applied) 及勘察核定之災損率 (disaster rate of investigation approved) 進行比較，如圖 11 所示。此處以災損倒伏率 20% 為基準線，當影像監督分類判釋所估算之水稻災損倒伏率與申請救助之災損率及勘察核定之災損率皆大於 20% (第一象限) 或小於 20% (第三象限)，表示影像監督分類判釋所估算之水稻災損倒伏率為正確推估。此處，監督判釋估算之水稻災損倒伏率比對申請救助之災損率之正確率為 92% (62/67)；另外，影像監督分類判釋估算之水稻

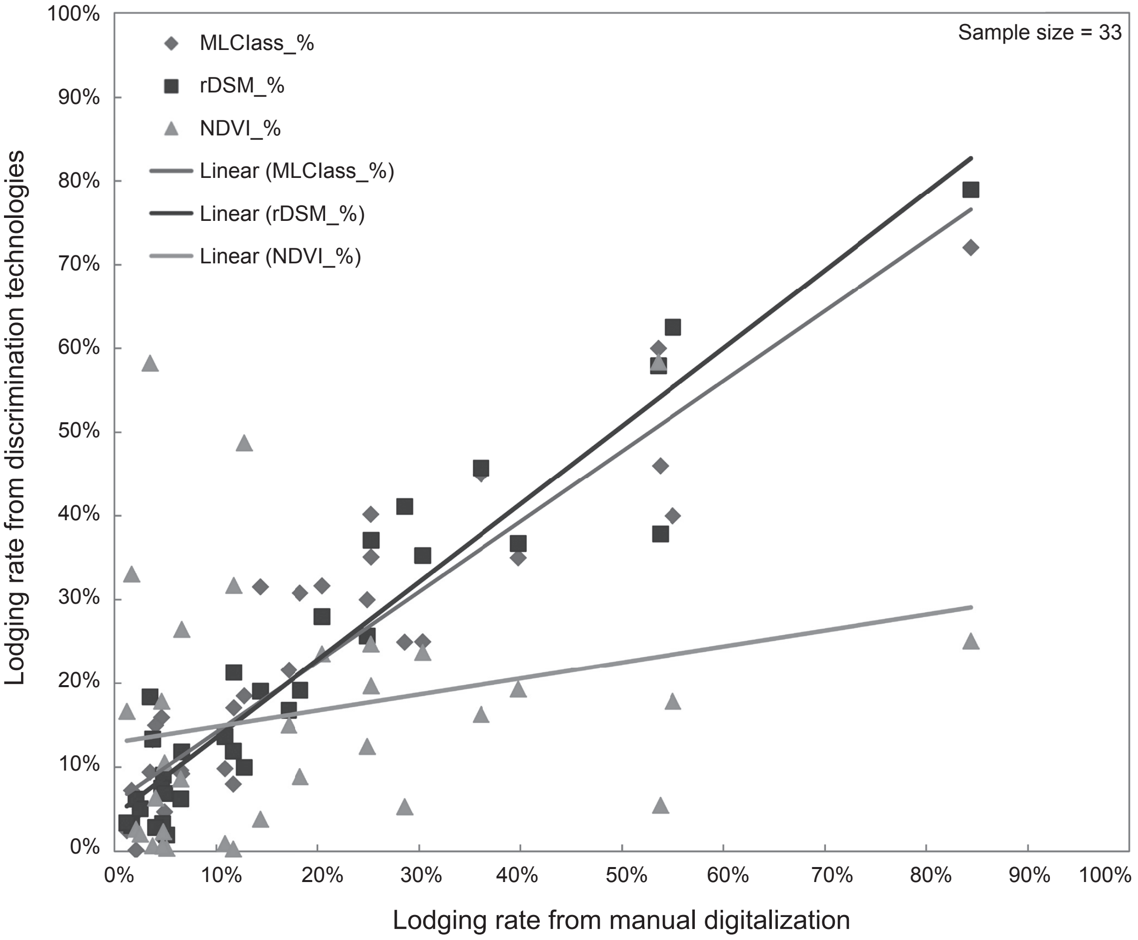


圖 9. 水稻倒伏災損判釋技術之成果與人工數化之水稻倒伏災損率統計相關比較。MLClass_%：影像監督分類之水稻倒伏災損率；rDSM_%：相對 DSM 之水稻倒伏災損率；NDVI_%：NDVI 分類之水稻倒伏災損率；Linear (MLClass_%)：人工數化與影像監督分類之水稻倒伏災損率之線性迴歸；Linear (rDSM_%)：人工數化與相對 DSM 之水稻倒伏災損率之線性迴歸；Linear (NDVI_%)：人工數化與 NDVI 分類之水稻倒伏災損率之線性迴歸)。

Fig. 9. Comparison of lodging rates between manual lodging digitalization and lodging discrimination technologies from image supervised classification, relative digital surface model (DSM), and normalized difference vegetation index (NDVI). MLClass_%: lodging rate of image supervised classification; rDSM_%: lodging rate of relative DSM; NDVI_%: lodging rate of NDVI classification; Linear (MLClass_%): linear regression of rice lodging rates between manual digitalization and image supervised classification; Linear (rDSM_%): linear regression of rice lodging rates between manual digitalization and relative DSM; and Linear (NDVI_%): linear regression of rice lodging rates between manual digitalization and NDVI classification).

災損倒伏率比對勘察核定之災損率之正確率也為 92% (62/67)。因此，透過影像監督分類判釋進行實地水稻災損倒伏率之估算應用，以災損率 20% (符合災損現金救助條件) 為基準，能獲得超過 9 成之災損判釋正確率。

其中，若現地勘查核定之災損率小於 20% (不符合現金救助條件)，但透過影像監督分類判釋出的災損率卻大於 20% (符合現金救助條件)，如圖 11B (第四象限) 所示，此處將會產生判釋上的爭議。因此，將此研究樣區 (圖 11 之 a、b、c、d) 擷取出，針對 UAV 航照與影像監督分類進行對照 (圖 12)，並討論其誤

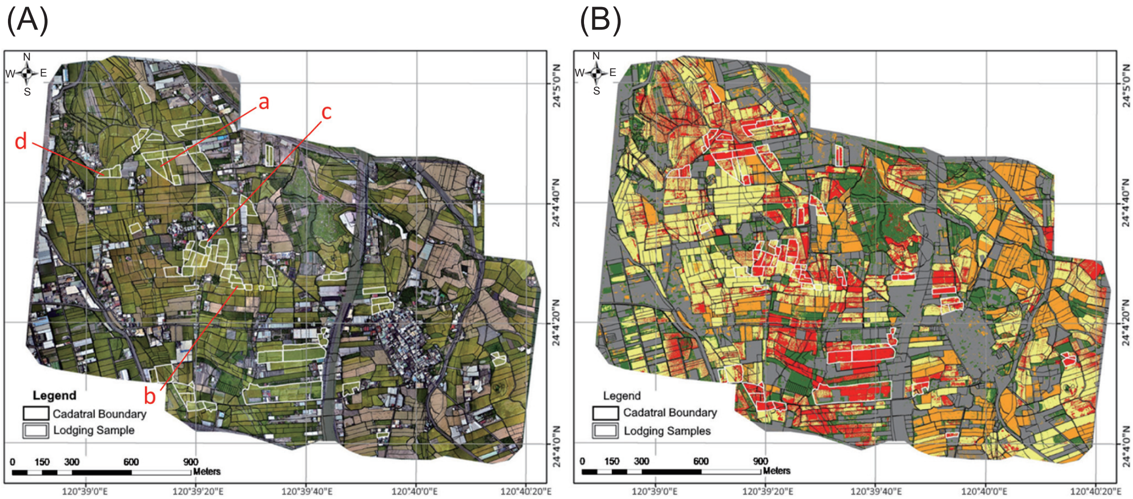


圖 10. 影像監督分類應用於臺中市霧峰區研究範圍之水稻倒伏判釋成果。(A) 航拍影像套疊地籍 GIS 圖層；(B) 影像監督分類套疊地籍 GIS 圖層 (圖例如圖 6 所示)；a、b、c、d 為圖 11 中 a、b、c、d 的坵塊位置。

Fig. 10. Rice lodging discrimination from image supervised classification in the study area, Wufeng District, Taichung City. (A) Aerial photography overlap with Cadastral GIS map. (B) Image supervised classification overlap with Cadastral GIS map (the legend is showed as Fig. 6). The a, b, c, and d are the locations of a, b, c, and d in Fig. 11.

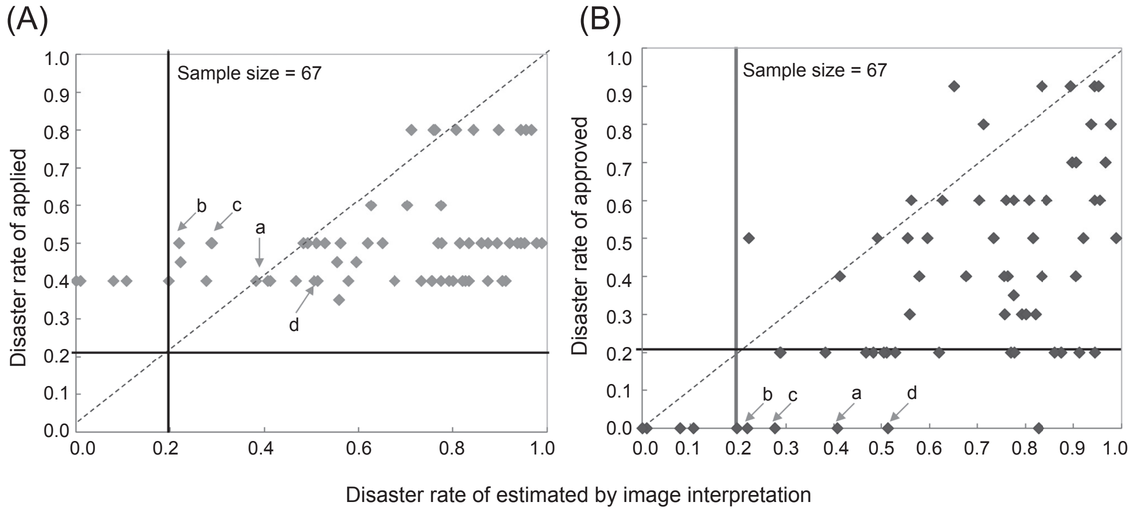


圖 11. 影像災損判釋率與 (A) 申請救助、(B) 勘查核定之災損率比較 (圖中對角線為 1 : 1 之比例)。

Fig. 11. Comparisons of disaster rates between estimated from image interpretation and statistical records from (A) compensation applied and (B) ground-based official approved (the diagonal line is the ratio 1 : 1).

差發生的可能原因。透過圖 12A–12C 所示，UAV 航照與影像監督分類皆顯示研究區域之水稻倒伏情形超過 20%。因此，若依據 UAV 航拍所提供的 GIS 輔助圖層，將推翻現地勘災核定之災損判釋結果。但圖 12D，依據 UAV 航照圖判釋，水稻倒伏情形不超過 20%，但是影像監督分類所判釋的水稻倒伏情形大於 50%，此為影像監督分類誤判情形。

另一方面，雖然影像監督判釋所估算的災損倒伏率，具有 9 成以上能反應實地水稻勘查

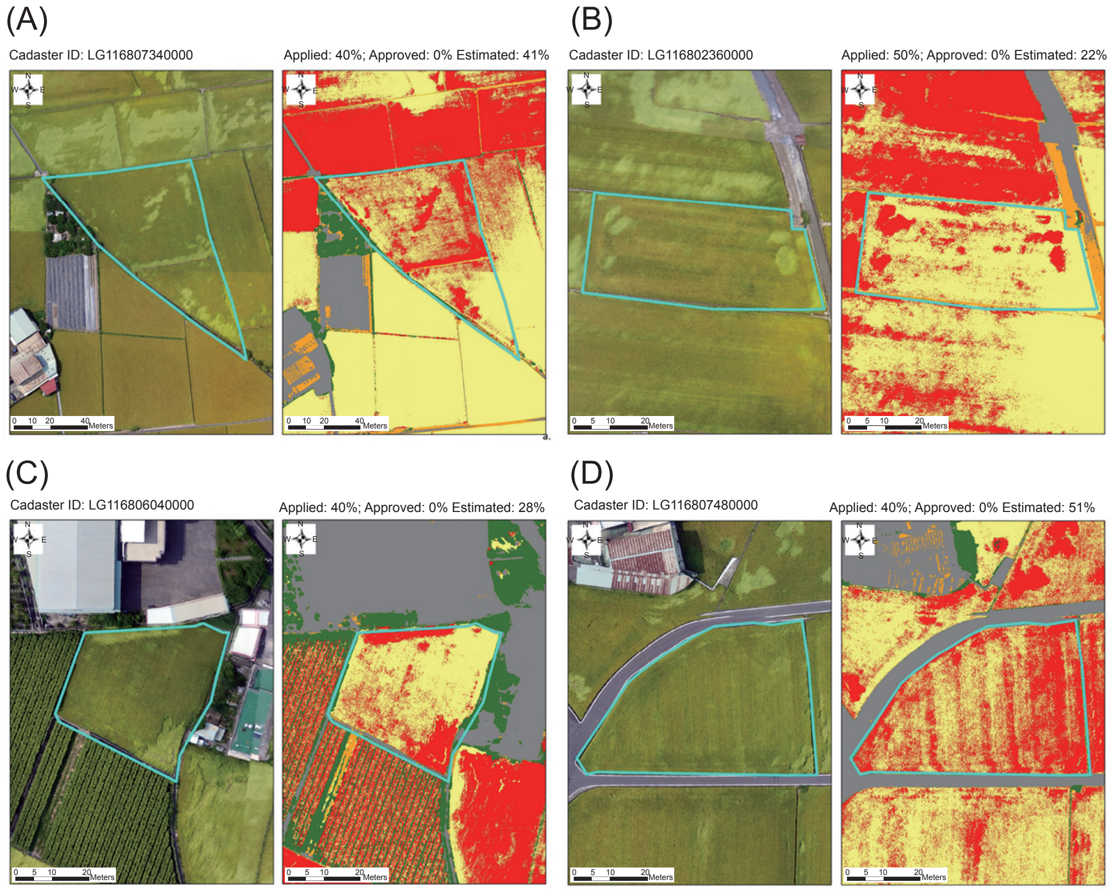


圖 12. 水稻災損倒伏之 UAV 航照與監督分類影像對照 (圖例如圖 6 所示)。

Fig. 12. Pair comparisons of rice lodging between unmanned aerial vehicle (UAV) photographs and supervised classification images (the legend is shown as Fig. 6).

之災損情形 (以災損率 > 20% 為基準)，但是前者所估算的災損率普遍大於申請救助與勘查核定的災損率。如圖 11 所示，取樣地籍大部分皆落於 1 : 1 對角線的右下方。此現象產生的原因，可能由於現地勘查人員的低估或是影像監督判釋的高估。因此，上述之誤差來源，可歸類為下列兩個方向：現地人員之判釋誤差與影像監督分類之判釋誤差。

現地人為判釋誤差主要發生於所勘查的位置與高度之限制，不易對整個地籍區域進行完整的調查，因此會有以偏概全的誤判產生；現地雖能夠觀察到較精準的災損情形，但對於大範圍災損面積的掌握，需要 UAV 航拍影像的協助。另一方面，影像監督分類所產生的災損判釋誤差，主要受到訓練樣區與航拍影像品質的影響。其中，選取訓練樣區的技術人員專業背景與經驗，影響訓練樣區的代表性；同時，影像監督分類成果也受 UAV 航拍影像的品質所影響，航拍影像只能呈現從空中的俯視角度，判釋地面目標物的解析能力受到航拍相機鏡頭、飛航穩定度與航高、地形複雜程度等影響。

結論

UAV 航拍影像能提供大範圍且高解析度之災後勘災輔助圖資，協助地方政府在黃金救援時間，即時掌握災損範圍與程度，進而規劃救災資源與優先順序之擬定。本研究應用 UAV 航拍影像所獲得之高解析度影像，透過

影像監督分類、NDVI 植生指數分類與 DSM 分類，針對 2017 年 6 月分連續超大豪雨對台中霧峰地區水稻所造成之災損倒伏情形，進行水稻倒伏災損影像判釋技術之發展，並比較不同災損影像判釋分類法對於水稻倒伏判釋準確度之比較。

結果顯示，UAV 航拍所得之可見光 RGB 正射影像，能清楚觀測水稻災損範圍與相對的災損情形。雖然現地勘查能夠觀察到較精準與細部的災損情形，本研究透過 UAV 航拍影像，對於大範圍災損面積能夠提供較完整的資訊；同時，透過影像分類的成果進行災損率的估算，能夠進一步掌握災損的具體程度與範圍。因此，針對災後即時且大範圍災區勘災工作時，本研究建議應用 UAV 航拍影像進行大範圍之災區勘災作業，並推薦應用影像監督分類進行災損判釋。透過 UAV 航拍影像與影像監督分類所得之災損判釋成果，進行交叉比對，以確認目標區域之災損情形。另外，針對 UAV 航拍影像與影像監督分類災損判釋，兩者間對於災損認定有所出入之坵塊區域，再輔以現地災損查核作業，透過階層分工的概念，發揮各種技術的最大功效，運用最精簡的時間與人力，提供最快速與最高品質的災損評估成果。因應航拍影像與影像判釋仍有誤差，建議應用於勘災時，可先篩出災損判釋結果大於 30% 之坵塊可不必人工勘災，小於 20% 者再進行人工勘災，以降低勘災人力。

本研究所依據之監督式分類，目前僅採用普遍且簡易的可見光鏡頭所獲取的 RGB 波段進行災損分析。未來的研究設計，將在研究方法與流程的改善下，整合 R、G、B、NIR 等多光譜影像進行監督式分類分析，以兼顧影像分析的效率、成果與可信度。

未來，在 UAV 航拍技術、影像處理與分析方法不斷地進展下，農業災害的勘災作業將會越來越有效率，且災損評估成果的準確性也將因此提升。現今的農業應用與發展，處於一個充滿新技術開發與整合多元開放的跨領域環境中。我們需要保持創新與勇於嘗試的態度，透過新科技的注入與新規範系統的建立，讓傳統農業的勘災與災損救助作業，能更具時效性與規模性。讓政府與民間單位能透過新科技的應用，增加合作的管道、凝聚研發的能量，以共同提升災後勘災與救災的效能。

誌謝

本研究承行政院農業委員會科技計畫「107 農科-7.8.4-農-C3」之經費補助；台中市政府霧峰區公所農業課劉式弘課長，提供 2017 年 6 月分霧峰地區之豪雨災損明細資料，行政院農業委員會農糧署企劃組調查分析科白旭凱技正，提供 2017 年 6 月分豪雨旱成之農業災情統計報告、農作物災害縣市別損失統計表與各縣市農作物災害報告等資料，特此致謝。

引用文獻

Agriculture and Food Agency. 2017a. Report of agricultural damage from extremely heavy rain on 20170613. Agriculture and Food Agency, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan. https://www.coa.gov.tw/theme_data.php?theme=news&sub_theme=agri&id=6961 (visit on 04/07/2019) (in Chinese)

Agricultural and Food Agency. 2017b. Statistic database of crop plantation area and production in Taiwan, 2017. Agricultural and Food Agency, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan. http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx (visit on 04/07/2019) (in Chinese)

Agriculture and Food Agency. 2018. Statistic database of agricultural damage from natural disaster between 2013 and 2017. Agriculture and Food Agency, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx (visit on 04/07/2019) (in Chinese)

Al-Rawabdeh, A., F. He, A. Moussa, N. El-Sheimy, and A. Habib. 2016. Using an unmanned aerial vehicle-based digital imaging system to derive 3D point cloud for landslide recognition. Remote Sens. 8:95–127.

Arbiol, R., Y. Zhang, and V. Palà. 2007. Advanced Classification Techniques: A Review. Rev. Cat. Geogr. Vol. 12, No. 32. Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya. Barcelona, Spain. http://www.rcg.cat/articles.php?id=98 (visit on 04/07/2019)

Burgan, R. E. and R. A. Hartford. 1993. Monitoring vegetation greenness with satellite data. Gen. Tech. Rep. INT-297. U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain Research Station. https://

www.fs.fed.us/rm/pubs_int/int_gtr297.pdf (visit on 04/07/2019)

Chang, K. W., Y. Shen, and J. C. Lo. 2005. Predicting rice yield using canopy reflectance measured at booting stage. Agron. J. 97:872–878.

Chang, K. W., S. Z. Wang, Y. Shen, J. C. Lo, D. M. Huang, and H. L. Tsay. 2006. Rice yield prediction using multispectral airborne images at booting stage. J. Photogramm. Remote Sens. 11:27–38. (in Chinese with English abstract)

Chang, K. W. and Y. Shen. 2011. Rice yield prediction using remote sensing images. J. Aeron. Astron. Avia., Ser. B 43:55–64. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C. and T. Y. Shih. 2007. Rice paddy identification using the support vector machine. J. Photogramm. Remote Sens. 12:225–240. (in Chinese with English abstract)

Chen, I. H. and Y. H. Tseng. 1999. Automatic recognition of rice fields from multi-temporal satellite images. J. Photogramm. Remote Sens. 4:1–15. (in Chinese with English abstract)

Chien, T. C., Y. A. Liou, and T. Y. Chang. 2008. Using remote sensing to estimate evapotranspiration of paddy field. J. Photogramm. Remote Sens. 13:1–18. (in Chinese with English abstract)

Chou, C. Y., S. Y. Wu, and C. L. Chen. 2018a. Application of unmanned aerial vehicle (UAV) photography on agricultural post-disaster investigation- A case study on image interpretation of banana plantation damages by disasters. J. Photogramm. Remote Sens. 23:83–101. (in Chinese with English abstract)

Chou, C. Y., S. Y. Wu, C. L. Chen, H. Y. Kuo, M. H. Yao, H. W. Tsai, Y. P. Wu, L. J. Liao, and Y. L. Chang. 2018b. Application of Unmanned Aerial Vehicle (UAV) on assisting agricultural disaster detection. Agric. Policy Rev. 307:113–117. (in Chinese)

Comba, L., A. Biglia, D. R. Aimonino, and P. Gay. 2018. Unsupervised detection of vineyards by 3D point-cloud UAV photogrammetry for precision agriculture. Comput. Electron. Agri. 155:84–95.

de Oliveira Silva, L., R. A. de Mello Bandeira, and V. B. G. Campos. 2019. Proposal to planning facility location using UAV and geographic information systems in a post-disaster scenario. Intl. J. Disaster Risk Reduct. 36:101080.

Environmental System Research Institute. 2019. An overview of the Image Classification toolbar. ArcMap 10.7 Spatial Analyst Extensions. Environ. Syst. Res. Inst., Sacramento, CA. http://desktop.arcgis.com/en/arcmap/latest/extensions/spatial-analyst/image-classification/an-overview-of-the-image-classification-toolbar.htm (visit on 04/07/2019)

Ezequiel, C. A. F., M. Cua, N. C. Libatique, G. L. Tangonan, R. Alampay, R. T. Labuguen, C. M. Favila, J. L. E. Honrado, V. Canos, C. Devancy, A. B. Loreto, J. Bacusmo, and B. Palma. 2014. UAV aerial imaging applications for post-disaster assessment, environmental management and infrastructure development. p.274–283. *in*: Proceeding of 2014 International Conference on Unmanned Aircraft Systems (ICUAS). May 27–30, 2014. Orlando, FL. IEEE Robotics & Automation Society, Piscataway, NJ.

Honkavaara, E., H. Saari, J. Kaivosoja, I. Pölönen, T. Hakala, P. Litkey, and J. Pesonen. 2013. Processing and assessment of spectrometric, stereoscopic imagery collected using a lightweight UAV Spectral Camera for precision agriculture. Remote Sens. 5:5006–5039.

Hsieh, C. Y., H. A. Chen, M. L. Tsai, Y. S. Lin, J. L. Chang, and C. F. Lo. 2018. Applications for spatial information and disaster reduction with unmanned aircraft system. Taiwan J. Geoinf. 6:75–95. (in Chinese with English abstract)

Hsu, R. and K. C. Chang. 2015. The use of innovative software Pix4D Mapper to optimize the process of generating spatial data from UAV's aerial images. J. Chinese Inst. Civ. Hydraul. Eng. 27:241–246. (in Chinese with English abstract)

Jhan, J. P., J. Y. Rau, C. C. Lin, and Y. C. Shao. 2011. Automatic tie-point matching using SURF-based image matching scheme. p.2336–2341. *in*: Proceeding of 32nd Asian Conference on Remote Sensing 2011 (ACRS 2011). October 3–7, 2011. Taipei, Taiwan. Asian Association on Remote Sensing, Tokyo, Japan.

Küng, O., C. Strecha, A. Beyeler, J. C. Zufferey, D. Floreano, P. Fua, and F. Gervaix. 2011. The accuracy of automatic photogrammetric techniques on ultra-light UAV imagery. https://infoscience.epfl.ch/record/168806/files/uavg.pdf (visit on 04/07/2019)

Lee, Y. J., C. M. Yang, K. W. Chang, and Y. Shen. 2011. Effects of nitrogen status on leaf anatomy, chlorophyll content and canopy reflectance of paddy rice. Bot. Stud. 52:295–303.

Lei, T. C., T. Y. Chou, and T. Y. Cheng. 2006. A study of extraction paddy field from QuickBird image. J. Photogramm. Remote Sens. 11:297–310. (in Chinese with English abstract)

Lei, T. C., S. Wan, C. Y. Huang, C. Y. Li, and C. H. Ouyang. 2013. Paddy rice objects generating and mapping model using aerial digital image data. J. Photogramm. Remote Sens. 17:95–114. (in Chinese with English abstract)

Lillesand, T. M. and R. W. Kiefer. 2000. Remote Sensing

and Image Interpretation. John Wiley & Sons, New York, NY. 736 pp.

Maes, W. H. and K. Steppe. 2019. Perspectives for remote sensing with unmanned aerial vehicles in precision agriculture. Trends Plant Sci. 24:152–164.

Näsi, R., E. Honkavaara, P. Lyytikäinen-Saarenmaa, M. Blomqvist, P.Litkey, T. Hakala, N. Viljanen, T. Kantola, T. Tanhuanpää, and M. Holopainen. 2015. Using UAV-based photogrammetry and hyperspectral imaging for mapping bark beetle damage at tree-level. Remote Sens 7:15467–15493.

Puig, E., F. Gonzalez, G. Hamilton, and P. Grundy. 2015. Assessment of crop insect damage using unmanned aerial systems: A machine learning approach. p.1420–1426. *in*: 21st International Congress on Modelling and Simulation (MODSIM2015). November 29–December 4, 2015. Gold Coast, Australia. The Australian Society for Operations Research, Canberra, Australia.

Remondino, F. 2011. UAV photogrammetry for mapping and 3D modeling- Current status and future perspectives. Intl. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spatial Inf. Sci. XXXVIII-1/C22:25–31.

Restas, A. 2015. Drone applications for supporting disaster management. World J. Eng. Technol. 3:316–321.

Ruiz, J. J., L. Diaz-Mas, F. Perez, and A. Vigurai. 2013. Evaluating the accuracy of DEM generation algorithms from UAV imagery. Intl. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spatial Inf. Sci. XL-1/W2:333–337.

Shen. Y., K. W. Chang, Y. J. Lee, C. M. Yang, and J. C. Lo. 2002. Preliminary study of rice yield estimation by remote sensing techniques. p.39–50. *in*: Knowledge and Technology for Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Spec. Pub. No. 101. Taichung, Taiwan. 221 pp. (in Chinese with English abstract)

Strecha, C., T. Tuytelaars, and L. Van Gool. 2003. Dense matching of multiple wide-baseline views. p.1194–1201. *in*: Proceeding of 9th IEEE International Conference on Computer Vision. October 13–16, 2003. Nice, France. IEEE Computer Society, Washington, DC.

Taichung District Agricultural Research and Extension Station. 2016. The rate of agricultural damage from natural disaster- Objective indicators. Agricultural and Food Agency, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan. 376 pp. (in Chinese)

Tola, E., C. Strecha, and P. Fua. 2012. Efficient large-scale multi-view stereo for ultra high-resolution image sets. Mach. Vision Appl. 23:903–920.

Tsai, M. L., K. W. Chiang, C. F. Lo, and J. Y. Rau. 2013. Directly georeferenced ground feature points with UAV borne photogrammetric platform without ground control. p.1523–1527. *in*: Proceedings of 2nd International Conference on Engineering and Technology Innovation (ICETI). November 2–6, 2012. Kaohsiung, Taiwan. Appl. Mech. Materials Vols. 284–287. Trans. Tech. Publications Ltd., Zurich, Switzerland.

Vega F. A., F. C. Ramírez, M. P. Saiz, F. O. Rosúa. 2015. Multi-temporal imaging using an unmanned aerial vehicle for monitoring a sunflower crop. Biosyst. Eng. 132:19–27.

Wan, S., S. H. Chang, and Y. K. Chen. 2016. The study of paddy-rice field image classification by bionics computation. J. Photogramm. Remote Sens. 21:55–64. (in Chinese with English abstract)

Wang, S. Z., C. C. Wu, and Y. Shen. 2007. Application of hyperspectral imager in precision agriculture. Instr. Today 161:22–28. (in Chinese with English abstract)

Wu, C. N., K. H. Hsia, W. C. Hsu, T. Y. Liao, T. K. Chen, and C. C. Lau. 2002. Preliminary study on using spaceborne and ground based remotely sensed data for rice growth and yield monitoring. p.19–38. *in*: Knowledge and Technology for Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Spec. Pub. No. 101. Taichung, Taiwan. 221 pp. (in Chinese with English abstract)

Wufeng District Office. 2016. Introduction to Wufeng: Agricultural development. Wufeng Dist. Office, Taichung City Gov., Taichung, Taiwan. https://www.wufeng.taichung.gov.tw/1212849/post (visit on 04/07/2019) (in Chinese)

Yang, C. M. and R. K. Chen. 2007. Differences in growth estimation and yield prediction of rice crop using satellites data simulated from near ground hyperspectral reflectance. J. Photogramm. Remote Sens. 12:93–105.

Yang, C. M., C. C. Liu, and Y. W. Wang. 2008. Using Formosat-2 satellite data to estimate leaf area index of rice crop. J. Photogramm. Remote Sens. 13:253–260.

Yang, M. D., K. S. Huang, Y. H. Kuo, H. P. Tsai, and L. M. Lin. 2017. Spatial and spectral hybrid image classification for rice lodging assessment through UAV imagery. Remote Sens. 9:583–602.

Yang, M. D. and H. P. Tsai. 2018. The revolution of unmanned aerial vehicle (UAV): Current status and future trend. Mag. Chin. Inst. Civ. Hydraul. Eng. 45:23–29.

Rice Lodging Detection Using the Photography from Unmanned Aerial Vehicle (UAV)

Chiao-Ying Chou[1], Shi-Yang Wu[2], and Chi-Ling Chen[3,*]

Abstract

Chou, C. Y., S. Y. Wu, and C. L. Chen. 2020. Rice lodging detection using the photography from unmanned aerial vehicle (UAV). J. Taiwan Agric. Res. 69(1):25–45.

The photography from unmanned aerial vehicles (UAV) provides multispectral images (i.e., red, green, blue, and near-infrared bands) and 3-dimensional points cloud with high-spatial-resolution and covering wide-region. In order to provide the maps for geographic information system (GIS) in assisting the agricultural post-disaster investigation, the goal of this study is to discover the most effective agriculture damage interpretation by using image discrimination technology with the characteristics of vehicle speed, convenience, and accuracy. In this study, image interpretation technologies, including image classification and digital surface model (DSM) classification, will be evaluated on the accuracy of rice lodging detection. Firstly, Pix4D Mapper, the professional photogrammetry and drone mapping software, is used to produce DSM and orthophotographs from the photography of UAV. Secondly, the image supervised classification, normalized difference vegetation index (NDVI) classification, and DSM classification are applied for detection of rice lodging in Wufeng District, Taichung City. The study area was damaged by the extremely torrential rain in a few days during the beginning of June, 2017. As a result, the damage region and the situation of rice lodging can be delineated by UAV orthophotographs. This study, especially on wide-region post-disaster investigation, recommends adoption of the image supervised classification on rice lodging detection, because the rate of accuracy between the disaster rate of estimation by image interpretation and the disaster rate of ground-based surveillance system reached 92.54% (under the baseline of 20% of disaster rate in accordance with the Implementation Rules of Agricultural Natural Disaster Relief). In addition, the accuracy of disaster interpretation can be improved by cooperating with the ground-based surveillance system. In conclusion, the agricultural post-disaster detection and rescue operations will be improved by the cooperation between new technologies and traditional labor-force. The capabilities and potentials from both sides need to be brought in to compensate one's shortcomings by using the individual strengths. With that, the efficiency and high-quality of damage detection can be achieved at least cost.

Key words: Agricultural damage, Image supervised classification, Digital surface model (DSM), Normalized difference vegetation index (NDVI), Disaster aid.

Received: May 14, 2019; Accepted: October 22, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: chiling@tari.gov.tw
[1] Postdoctoral Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Project Assistant, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):46–64 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0004

研究報告

夜香花嵌紋病毒百香果分離株分子特性及廣效性分子檢測技術之開發應用

李文立 [1] Chinnapan Thanarut [2] 徐智政 [3] 李國基 [4] 江芬蘭 [5] 陳金枝 [6,*]

摘要

李文立、Chinnapan Thanarut、徐智政、李國基、江芬蘭、陳金枝。2020。夜香花嵌紋病毒百香果分離株分子特性及廣效性分子檢測技術之開發應用。台灣農業研究 69(1):46–64。

本研究以細菌生合成系統誘導表現之夜香花嵌紋病毒 (*Telosma mosaic virus*; TeMV) 鞘蛋白 (coat protein; CP) 作為抗原，製備出具有廣效檢測 TeMV、*East Asian passiflora virus* (EAPV)、*Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV) 及 *Soybean mosaic virus* (SMV) 等馬鈴薯 Y 屬病毒之多元抗體。針對台灣百香果 TeMV-DC6 分離株對應其全長度基因體核酸序列，共解得 10,022 個核苷酸，於 GenBank 登錄序號為 MN316594。2017–2019 年期間，利用所研製之 TeMV 多元抗體與引子對，調查台灣田間百香果之 TeMV 發生率大約 32.1–35.8%；而由泰國採集之 17 個葉片嵌紋與果實木質化的樣品，TeMV 檢出率為 100%。台灣及泰國百香果田間所收集之 TeMV 分離株，與泰國已發表之百香果 TeMV (AM409188) 之間的 CP 胺基酸序列，相同度均高達 90% 以上；但不同地理位置所分離到的百香果 TeMV 分離株在類緣演化上具有差異性，TeMV-DC6 等 9 個台灣分離株自成一類群，與 17 個泰國分離株有所區隔。依據台灣和泰國 TeMV 分離株設計 3 組引子對，以 RT-PCR 法檢測兩地之田間百香果 TeMV 罹病組織，在受測 67 個台灣分離株和 17 個泰國分離株中，台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d) 可檢出所有受測的台灣分離株及 9 個泰國分離株；而泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 僅檢出 12 個泰國分離株，且無法檢出全部的台灣分離株；由台灣泰國廣效性引子對 (TwTha840u/TwTha840d) 則可檢出全部受測的台灣和泰國分離株。本研究結果顯示，目前台灣和泰國百香果之 TeMV 發生概況，並首度完成台灣分離株 TeMV-DC6 之全長度基因體核酸序列之定序，釐清台灣與泰國 TeMV 不同分離株之類緣差異性，並開發可廣效性檢測台灣和泰國百香果 TeMV 分離株之引子對，可提升對不同來源 TeMV 之檢測效率。

關鍵詞：百香果、夜香花嵌紋病毒、多元抗體、全長度核酸序列、RT-PCR 廣效性檢測。

前言

百香果 (*Passiflora* spp.) 原產於南美巴西，為熱帶亞熱帶週年生果樹。百香果為具有高經濟價值與廣被多元利用的果樹，素有「果汁之王」和「水果藥王」美稱，在全球果汁工業上具有重要地位。百香果栽培過程中容易遭受病毒、真菌、蟲害等危害，尤以引起木質化徵狀之病毒影響百香果生育及產值最鉅 (Liberato & Zerbini 2019)，更是種苗貿易流通時被檢視的檢疫病原對象。台灣商業化栽培百香果已超過 30 年，以每年全園換植健康種苗，施行

投稿日期：2019 年 9 月 7 日；接受日期：2019 年 10 月 24 日。
* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所研究員兼分所長。台灣 高雄市。
2 清邁大學農業生產學院講師。泰國 清邁市。
3 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員。台灣 高雄市。
4 農委會科技處技術服務科科長。台灣 台北市。
5 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
6 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

一年生栽培方式有效地控管百香果病毒病害，並創造了百香果種苗產業的貿易經濟效益。

國際間百香果的病毒種類，紀錄上約有 20 種，涵蓋 *Carlavirus*、*Cucumovirus*、*Cilevirus*、*Nepovirus*、*Potyvirus*、*Rhabdovirus*、*Tobamovirus* 及 *Tymovirus* 屬之病毒 (Spiegel *et al*. 2007; Parrella & Lanave 2009; Coutts *et al*. 2011; Song & Ryu 2011; Liberato & Zerbini 2019)。亞洲地區已知百香果病毒種類，包括 (1) 2 種東亞百香果病毒 (*East Asian passiflora virus*; EAPV) 類群：EAPV-AO 類群主要引起葉片嵌紋和果實木質化 (Iwai *et al*. 2006a)；EAPV-IB 分離株類群引起斑駁或輕微嵌紋病徵 (Fukumoto *et al*. 2012)；(2) 豇豆蚜傳嵌紋病毒 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*; CABMV)，即前稱在台灣引起漣葉徵狀的百香果漣葉病毒 (*Passionfruit crinkle virus*; PCV) (Chang & Lin 1989)，近十多年來，未再於台灣百香果上發現此病毒；(3) 胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 引起葉片黃斑病徵 (Liberato & Zerbini 2019)；(4) 夜香花嵌紋病毒 (*Telosma mosaic virus*; TeMV) 為近年於泰國百香果上發現的病毒 (Chiemsombat *et al*. 2014)，引起葉片嵌紋、果皮嵌紋和木質化病徵；(5) 2 種 *Begomovirus* 屬病毒：包含聖誕紅捲葉病毒 (*Euphorbia leaf curl virus*; EuLCV) 及木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl Guangdong virus*; PaLCuGDV)，首次由台灣學者報導可發生於百香果 (Cheng *et al*. 2014)，常伴隨於寒流低溫氣候下發病而引起葉片嵌紋皺縮，氣溫回暖後新生的葉片恢復無病徵。EuLCV 在中國大陸、台灣和南韓均有發生，2004 年在中國聖誕紅被發現 (Ma *et al*. 2004)；南韓也報導 EuLCV 可感染百香果和木瓜 (Kil *et al*. 2016)。而 PaLCuGDV 於 2004 年由中國大陸學者首次報導 (Wang *et al*. 2004)，因此在中國大陸和台灣均有發生。

國外已報導之其他百香果病毒種類 (Fischer & Rezende 2008; Parrella & Lanave 2009; Baker et al. 2014; Liberato & Zerbini 2019)，包括 *Potyvirus* 屬之 *Passiflora chlorosis virus* (PaCV)、*Passiflora virus* Y (PaVY)、*Soybean mosaic virus* (SMV)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV) 和 *Passion fruit woodiness virus* (PWV)；*Tobamovirus* 屬之 *Tobacco mosaic virus* (TMV)、*Maracuja mosaic virus* (MarMV) 及 *Passion fruit mosaic virus* (PafMV)；*Rhabdoviridae* 科 *Cilevirus* 屬之 *Passion fruit green spot virus* (PGSV) 及 *Rhabdovirus* 屬之 *Passion fruit vein clearing virus* (PVCV)；*Carlavirus* 屬之 *Passiflora latent virus* (PLV)；*Nepovirus* 屬之 *Tomato ringspot virus* (ToRSV)；*Tymovirus* 屬之 *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV)，及 *Begomovirus* 屬之 *Passion flower little leaf mosaic virus* 和 *Jatropha mosaic virus*。

木質化病毒為影響百香果生育之主要病毒，目前國際間引起百香果木質化的病毒種類包括澳洲的 PWV (Wylie & Jones 2011)、巴西的 CABMV (Nascimento *et al*. 2006)、泰國的 TeMV (Chiemsombat *et al*. 2014)；而日本、台灣、中國大陸和東南亞等亞洲地區主要為 EAPV 感染所引起 (Iwai *et al*. 2006b; Chong *et al*. 2018)。引起台灣嚴重型木質化病徵之主要病徵為 EAPV 的 AO 系統 (Chang *et al*. 2017; Chong *et al*. 2018)。

TeMV 為 *Potyvirus* 屬病毒，首次由 Ha *et al*. (2008) 發表可感染夜香花 (*Telosma cordata*) 引起嵌紋病徵；泰國學者於 2014 首次發表其可引起百香果植株葉片嵌紋及果實木質化徵狀 (Chiemsombat *et al*. 2014)。近年來亞洲地區陸續發現 TeMV 發生於百香果，包括中國大陸 (Xie *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018c; Yang *et al*. 2018) 和作者於 2017 年 11 月鑑定出台灣百香果之 TeMV，並通報行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 (https://phis.baphiq.gov.tw/WebEvery.nsf/AttachFileView/36DCDBCA374F9E1B482581E700111112Form0?OpenDocument&page=Center)；同時期，台灣學者 (Chen *et al*. 2018a; Tsai *et al*. 2018) 於 2017–2018 年期間發表百香果上發生此病毒。文獻紀錄上 TeMV 的寄主包括有夜香花 (Ha *et al*. 2008)、廣藿香 (*Pogostemon cablin*) (Noveriza *et al*. 2012)、翼柄決明 (*Senna alata* L.) (Yao *et al*. 2019) 和百香果 (Xie *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018c; Yang *et al*. 2018)。

本研究利用細菌生合成系統表達 TeMV-

CP 作為抗原，以製備病毒之多元抗體分析台灣和泰國 TeMV 分離株之鞘蛋白核酸類緣關係，以及設計核酸引子對實用於百香果 TeMV 病毒之檢測鑑定，以提升對國際間不同來源 TeMV 之檢測鑑定之準確度。另外，首次完成百香果 TeMV 台灣分離株之全長度基因體的核酸定序與比對分析。

材料與方法

病毒及罹病組織

台灣來源之百香果罹病組織

本研究採用 2017–2019 年期間，由國內的南投埔里及台中霧峰區和后里區田間檢出 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 之百香果葉片組織，於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 中，可與台灣分離株所設計的 TeMV 引子對 (TwTe650u/TwTe650d) (表 1) 反應者進行試驗；其中代號 DC6 罹病組織接種於奎藜 (*Chaenopodium quinoa*) 進行 3 次單斑分離，獲得 TeMV-DC6 之純系分離株。將此分離株接種於黃百香果造成嵌紋徵狀 (圖 1B)，隨後取 TeMV-DC6 罹病葉片進行病毒全長度基因體核酸選殖與定序試驗。相關百香果罹病組織和奎藜單斑罹病葉片浸漬於 50% (v/v) 甘油中，保存於 -20℃下供後續試驗所需。

泰國來源之百香果罹病組織

2019 年 3 月於泰國之曼谷 (Bangkok)、清邁 (Chiang Mai) 和清萊 (Chiang Rai) 等地之百香果田區採取葉片嵌紋徵狀者 (圖 1C–1D、圖 1E–1F)，樣品乃透過行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之「特定植物檢疫物及物品輸入辦法」核准輸入 (輸入許可證號 108-V-500)，於隔離管制規範條件下進行病毒鑑定之相關試驗。試驗完畢依規定以高溫高壓滅菌法 (121℃、20 min) 將材料進行消毒與銷毀。

細菌生合成系統表現 TeMV-CP 及其多元抗體製備

本試驗於 2016 年國內尚未發現 TeMV 時，參考 GenBank 已登錄之泰國百香果 TeMV 鞘蛋白基因 (coat protein gene; TeMV-CP) 序列，委託波仕特生物科技股份有限公司 (台灣台北市) 進行其全長度 CP 核苷酸合成，並構築於 pET28a (+) 質體上 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，質體代號為 pET-TeMVCP。所合成之核酸片段，包含有對應全長度 CP 之 816 個核苷酸 (nucleotide; nt) 及 CP 核苷酸終止碼 (TAA)、2 種限制酶切位 (5’ 端之 *Nco*I 和 3’ 端之 *Xho*I 切位)。

將 pET-TeMVCP 質體轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3)，進行 TeMV-CP 之表現蛋白誘導與純化，相關試驗方法參照以往研究報告進行 (Chen *et al*. 2018b)。純化後的 TeMV-CP 表現蛋白，其抗原表現評估，於西方墨點法中以市售 *Potyvirus* 屬單元抗體 (Agdia Inc. Elkhart, IN, USA) 確認之，西方墨點法試驗步驟參照以往研究報告進行 (Chen *et al*. 2018b)。

進一步選用確定有表現 TeMV-CP 之選殖株，進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al*. 1998; Chen *et al*. 2018b)，將純化之表現蛋白濃縮為 1 mg mL^{-1} 以做為抗原，並送交濁水溪

表 1. 應用於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應以檢測 *Telosma mosaic virus* 之引子對序列。

Table 1. The primer pairs used for the detection of *Telosma mosaic virus* in reverse transcription-polymerase chain reaction.

Primer pair	Primer sequence	Annealing temp.	Amplicon (bp)
1. TwTe650u	5’GTTGAGCAACTCAAAAATC 3’ (19-mer)	52℃	650
TwTe650d	5’TTT TATTTGTAGTGCCAAC 3’ (19-mer)		
2. ThaTe430u	5’AGAAGCCTGGGGCCACACA 3’ (19-mer)	52℃	430
ThaTe430d	5’GCCTTTAACCATTGGAAGA 3’ (19-mer)		
3. TwTha840u	5’GAAAGTGCATTGAGAAAGC3’ (19-mer)	52℃	840
TwTha840d	5’CATCAATCCAAACATCTT 3’ (19-mer)		

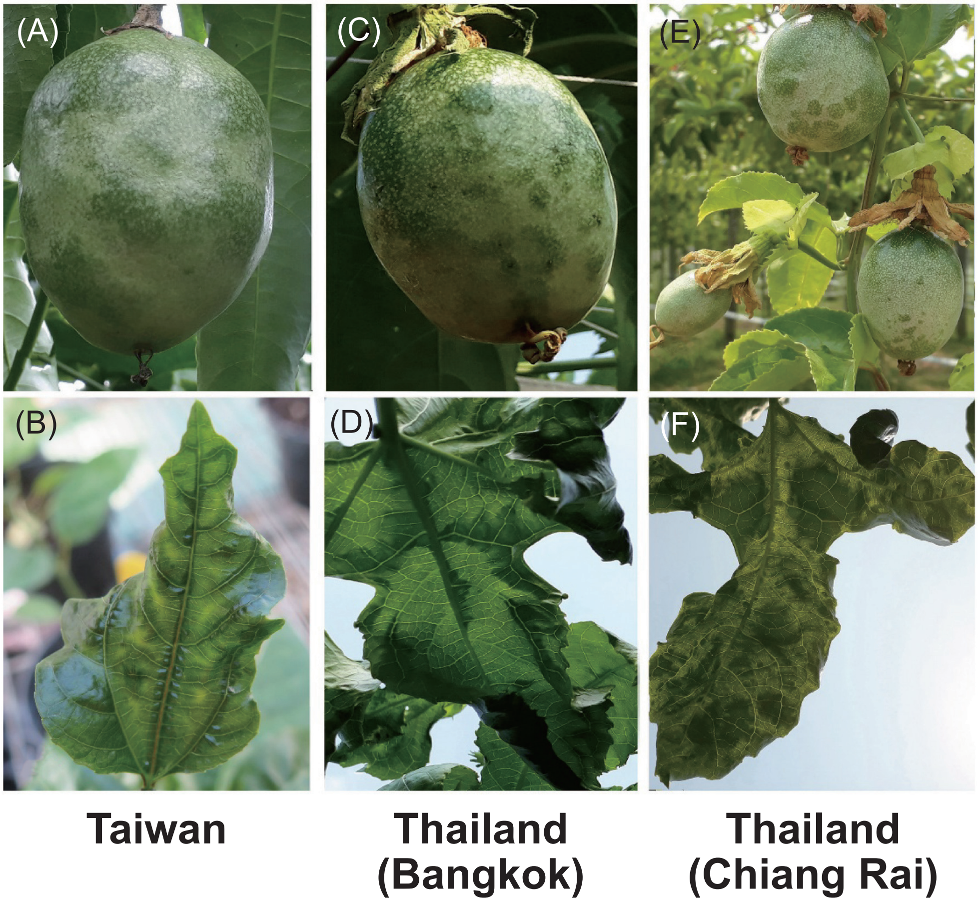


圖 1. 台灣和泰國田間百香果檢出受 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 感染之病徵。(A) 台灣罹病株果實著綠不均及木質化；(B) TeMV-DC6 接種於百香果葉片呈現嵌紋徵狀；(C、D) 泰國曼谷 (Bangkok) 和 (E、F) 泰國清萊 (Chiang Rai) 之田間罹病株果實木質化和葉片嵌紋病徵圖。

Fig. 1. Symptoms of *Telosma mosaic virus* (TeMV)-infected passiflora in the fields of Taiwan and Thailand. (A) Uneven greening and woodiness on an infected fruit and (B) TeMV-DC6 inoculated *Passiflora* sp. showing mosaic symptoms on leaves. Symptoms of woody fruits and mosaic leaves on diseased field passionfuit plants collected in (C, D) Bangkok and (E, F) Chiang Rai, Thailand.

生物科技有限公司 (台灣桃園市) 進行每週 1 次、連續 4 wk 的兔免疫注射以製備多元抗體。

TeMV-CP 多元抗體之檢測效果測試

本試驗參照 indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) 法 (Clark & Adams 1977; Chang *et al*. 1988; Chen *et al*. 2018b)，進行受測樣品與 TeMV-CP 多元抗體之反應。為評估本自製多元抗體之檢測效果，受測標準樣品，包括 2017–2018 年於國內田間百香果田採集之 9 個 TeMV 分離株，和本研究室保存之不同 *Potyvirus* 屬病毒罹病組織 (表 2)。其中，文獻紀錄上可感染百香果之 potyviruses，包括 EAPV、CABMV、BYMV 及 SMV (Fischer & Rezende 2008; Parrella & Lanave 2009)。取 0.1 g 之受測樣品組織進行免疫反應試驗，呈色反應以 150 μL/孔之比例加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Solon, OH, USA) 進行。反應 20 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃

表 **2.** 利用細菌表現 *Telosma mosaic virus* 鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附分析 (indirect-ELISA) 檢測不同 *Potyvirus* 屬病毒之效果。

Table 2. Detection effeciency of the polyclonal antibody produced with bacterial expressed coat protein of *Telosma mosaic virus* on various potyviruses in indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Antigen[z]	ELISA reading (A_{405nm})[y]
Telosma mosaic virus (TeMV)-DC6	1.64
TeMV-DC3	1.27
TeMV-DC4	1.39
TeMV-DC33	0.41
TeMV-LSS18	1.42
TeMV-LSS30	1.38
TeMV-WFS1	1.42
TeMV-WFS2	1.89
TeMV-WFS4	1.72
East Asian passiflora virus (EAPV)-AO	0.86
East Asian passiflora virus (EAPV)-IB	1.13
Cowpea aphid born mosaic virus (CABMV)	0.54
Soybean mosaic virus (SMV)	0.70
Bean yellow mosaic virus (BYMV)	0.38
Lily mottle virus (LiMV)	0.50
Turnip mosaic virus (TuMV)	0.20
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	0.46
Ornithogalum mosaic virus (OrMV)	0.47
Butterfly flower mosaic virus (BFMV)	0.38
Potato virus Y (PVY)	0.57
Basella rugose mosaic virus (BarMV)	0.30
Dasheen mosaic virus (DMV)	0.89
Konjac mosaic virus (KoMV)	0.44
Zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV)	0.50
Papaya ringspot virus (PRSV)	0.63
Positive control (BEP)	1.87
Healthy control threshold	0.21

[z] Tested potyviruses are stock materials in the laboratory. Nine TeMV isolates were collected from passiflora fields during 2017–2018 in Taiwan.

[y] The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with ELISA readings lower than the healthy control threshold were considered undetectable by indirect ELISA. Positive control is the bacterial expressed TeMV-CP (BEP).

度高低之依據。樣品吸光值大於 2× 之健康葉片吸光值者，判讀為正反應。

病毒 3’ 端核酸片段之定序分析

本試驗針對 9 個台灣分離株和 17 個泰國分離株進行病毒 3’ 端核酸片段之定序分析 (表 3)，步驟如下：

核酸純化：取 0.1 g 之受測罹病組織樣品，依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corparation, Taipei, Taiwan) 之步驟，進行供試植物組織樣品全量核醣核酸 (total RNA) 之萃取。

單步驟 RT-PCR 法：以純化所得之 RNA 為模板，以 *Potyvirus* 屬病毒之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ (5’ATGATHGARKCNTGGGG3’/5’GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT3’) (Pappu *et al*. 1998; Chen *et al*. 2006) 進行病毒基因體 3’ 端約 1.3 kbp 核酸片段之單步驟 RT-PCR 反應。RT-PCR 依據試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一 25 µL 反應液中分別加入 1 µL 之全量 RNA、12.5 µL 之 2× Reaction Mix、0.5 µL 之 SuperScript III RT-/Platinum Taq Mix、各 1 µL 之 10 µM 上游和下游引子和 9 µL 之 DEPC-treated water。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany) 中進行。設定反應程序為：50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、52℃下煉合 50 s，72℃下聚合 1 min 30 s，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析：以 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 引子對所增幅出的 1.3 kbp 核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems 載體上 (Promaga, Madison, WI, USA)，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，進行核酸選殖與定序分析。所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., Bethesda, MD, USA) 分析軟體進行分析，並

表 3. 不同來源的 *Telosma mosaic virus* 百香果分離株之鞘蛋白核酸與胺基酸序列相同度比較表。

Table 3. Sequence identities of the nucleic acid and deduced amino acid between the coat protein (CP) gene of the *Telosma mosaic virus* (TeMV) Thailand isolate Pangda 15 from *Passiflora* sp. to that of those TeMV isolates available in GenBank.

			% Identity[y]	
Acc. No.[z]	Source & isolate	Length of CP nts	CP-nt	CP-aa
AM409188	Thailand/Pangda15	816	100.0	100.0
NC_009742	Vietnam/Hanoi	816	86.0	89.0
MH137276	China/YN1	816	87.6	90.1
KJ789129	China/GX1	816	91.1	94.5
MG944249	China/PasFru	816	92.2	94.5
MN316594	Taiwan/DC6	816	91.4	93.8
MH500098	Taiwan/DC3	816	90.9	93.0
MH500099	Taiwan/DC4	816	91.3	93.8
MH500101	Taiwan/DC33	816	91.2	93.8
MH500102	Taiwan/LSS18	816	91.4	93.8
MH500103	Taiwan/LSS30	816	91.4	93.8
MH500104	Taiwan/WFS1	816	91.3	93.4
MH500105	Taiwan/WFS2	816	91.4	93.8
MH500106	Taiwan/WFS4	816	91.4	93.8
MN384677	Thailand/TL1	816	87.9	91.9
MN384678	Thailand/TL2	816	87.6	91.5
MN384679	Thailand/TL3	816	91.2	94.5
MN384680	Thailand/TL4	816	87.7	91.4
MN384681	Thailand/TL5	816	89.8	92.6
MN384682	Thailand/TL6	816	91.7	94.5
MN384683	Thailand/TL7	816	91.5	93.8
MN384684	Thailand/TL8	816	89.7	90.1
MN389475	Thailand/TL9	816	93.6	94.9
MN389476	Thailand/TL10	816	87.9	91.5
MN389477	Thailand/TL11	816	88.1	91.9
MN389478	Thailand/TL12	816	87.5	91.5
MN389479	Thailand/TL13	816	91.7	91.2
MN389480	Thailand/TL14	816	90.6	91.5
MN389481	Thailand/TL15	816	91.8	94.5
MN395825	Thailand/TL16	816	87.0	90.1
MN395824	Thailand/TL17	816	87.3	90.4

[z] The sequence of TeMV isolate Pangda 15 (AM409188, Chiemsombat *et al*. 2014) was used for leader comparison. TeMV isolate Hanoi (NC_009742) was isolated from *Telosma cordata* (Ha *et al*. 2008); and TeMV isolate YN1 (MH137276) was isolated from *Senna alata* L. (Yao *et al*. 2019; direct submission).

[y] Percent identities (%) of the respective nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences were analyzed by the Vector NTI Suite (InforMax Inc., Bethesda, MD, USA).

與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 已登錄的 TeMV 病毒之 CP 核苷酸和胺基酸序列進行比對分析。

TeMV-DC6 分離株全長度基因體核酸之選殖及序列分析

將本研究之 TeMV-DC6 分離株，以其經由 3 次奎藜單斑分離，並回接於百香果之罹病葉片所抽取之全量核酸為模板。先以 HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$ 引子對所增幅出之病毒 3’ 端約 1.3 kbp 核酸片段已知序列為基礎，與 GenBank 資料庫上已登錄之全長度 TeMV 核苷酸序列比對，設計可包含對應大蛋白 (polyprotein) 核苷酸之上游引子對，而下游引子對則依據已選殖定序之 TeMV-DC6 序列做設計。以 RT-PCR 法配合不同引子對組合 (圖 2B)，由 TeMV-DC6 核苷酸序列 3’ 端往 5’ 端之方向陸續進行本分離株全長度核酸序列之增幅、選殖與定序 (圖 2A)。設計使用的引子對組合包括 5’Te11u/Te1045d、Te976u/Te3155d、Te2697u/Te3770d、Te3626u/Te5001d、Te4911u/Te6699d、Te6642u/Te8397d、HRP-5/Oligo-d (T)$_{14}$，引子之序列詳如圖 2B。單步驟 RT-PCR 增幅之黏合溫度與反應時間，除 Te2697u/Te3770d 於 42℃/50s 條件進行外，其他各引子對之黏合溫度條件為 52℃/50s。

針對全長度基因體之選殖，將上述各不同引子組增幅所得之核酸片段，構築於 pGEM-T Easy Vector Systems，經篩選出含有特定片段之嵌入序列選殖株各 3 個，進行核苷酸定序分析。病毒基因體之 5’ 端核苷酸序列，將不採計簡併式引子 (5’Te11u) 序列所黏合處之 18 個核苷酸。

TeMV 分離株之類緣關係分析

本研究以 RT-PCR 法，分別由台灣和泰國採集之百香果 TeMV 罹病組織，先以 Potyvirus 屬病毒的簡併式引子對 HRP 5/Oligo-dT$_{(14)}$ 進行其 3’ 端約 1.3 kbp 之核酸片段增幅與選殖後進行核苷酸定序。選用對應 CP 區域之核苷酸和胺基酸序列，以 Vector NTI Suite 分析軟體進行序列相同度 (% identity) 分析；另進行類緣關係分析 (phylogenetic analysis)，依據 Tomimura *et al*. (2003) 所發表的方法進行。所有序列先以 CLUSTAL X version 1.8 (Thompson *et al*. 1997) 彙整分析後，再利用 PAUP 4.0 程式，以 neighbor-joining (NJ) 方法建構親緣關係樹，並結合 BRM 法 (bootstrap resampling method) (Felsenstein 1985; Thompson *et al*. 1997) 評估關係樹分群的統計顯著性。

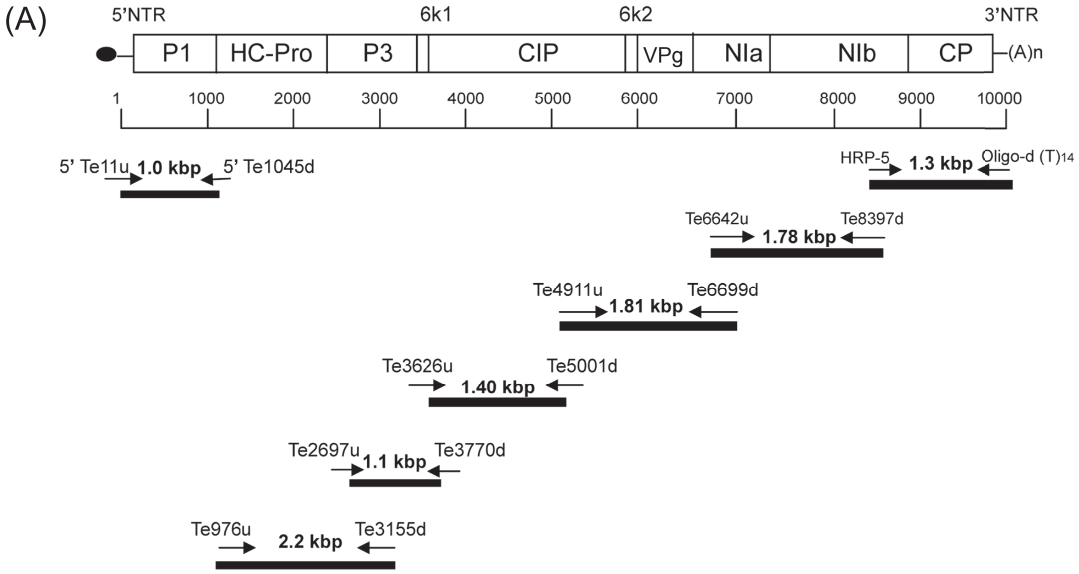
台灣和泰國來源之 TeMV 分離株個別引子對之設計與測試

依據表 3 所列由本研究所分離之 9 個台灣 TeMV 分離株，和 17 個泰國分離株所解得之 3’ 端 1.3 kbp 核苷酸序列設計不同之引子對，分別有「台灣分離株」引子對 TwTe650u/TwTe650d、「泰國分離株」引子對 ThaTe430u/ThaTe430d、以及可同時檢測兩地之「台灣泰國分離株」引子對 TwTha840u/TwTha840d。相關引子序列及反應條件詳見表 1。取台灣和泰國採樣之百香果罹病組織，純化其全量核酸做為模板進行單步驟 RT-PCR 反應。反應成分參照市售檢測試劑套組進行 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)，於反應條件為 50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、52℃下煉合 50 s，72℃下聚合 1 min 30 s，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠進行分析判讀結果。

各組引子對可增幅出之核酸片段產物預估分別是 TwTe650u/TwTe650d 為 650 bp、ThaTe430u/ThaTe430d 為 430 bp、TwTha840u/TwTha840d 為 840 bp，依據預估之產物評估各組引子對之檢測效果。

台灣和泰國 TeMV 分離株引子對檢測台灣田間百香果罹病樣品之效果

由上述已建立之 3 組 TeMV 引子對 (TwTe650u/TwTe650d、ThaTe430u/ThaTe430d 和 TwTha840u/TwTha840d) 於台灣和泰國 TeMV 分離株之檢測差異性，收集台灣田間罹染 TeMV 之百香果大量樣品，並與泰國 17 個 TeMV 分離



(B) **5'Te11u: 5'-CAACTCGGCAAGACATAA3'**
5'Te1045d: 5'-GACGGCTTTCTTAGGAGT3'
Te976u: 5'-GATGTGCTGGGTTCAAC3'
Te3155d: 5'-GCTGTTTGAGGCTTCTG3'
Te2697u: 5'-AAAGATCAGAATGTGGCTA3'
Te3770d: 5'-CTGTTGGTTCCTTACTTGTG3'
Te3626u: 5'-TGAAAGAAGTGATGCYCTCT3'
Te5001d: 5'-TGCATRCTCCCATCATATTT3'
Te4911u: 5'-ACAACAAATMTKYTKTCCA3'
Te6699d: 5'-TCTGAAACTGTTGCYCTA AG3'
Te6642u:5'-AGTCCA AAGAAAGAAGAGAG3'
Te8397d: 5'-TCTGTAARCAATTCWGTRTG3'
HRP-5: 5'-GCGGGATCCGTNTGYGTNGAYGAYTTTYAAYAA3'
Oligo-d(T)$_{14}$: 5'-GCGGCCGC(T)$_{14}$

圖 2. *Telosma mosaic viru*s DC-6 分離株全長度基因體之增幅與構築策略。

Fig. 2. The strategy for determining the complete RNA genomic sequence of *Telosma mosaic virus* DC-6 (TeMV-DC6). (A) Schematic representation of the genetic structure of TeMV-DC6 and the overlapped cDNA fragments amplified from reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) by the designed primers. Black bars represent length of amplified DNA fragments. (B) Sequences of the primers used in RT-PCR.

株，以上述 3 組引子對分別進行檢測，評估其對於台灣和泰國不同來源 TeMV 分離株之檢出率差異，以及其檢測鑑別效果，以開發可簡易判斷病毒株來源地或可同時檢出不同地方來源 TeMV 之廣效性引子對。

結果

TeMV-CP 多元抗體檢測評估

台灣 TeMV 分離株與不同 potyviruses 檢測效果

本研究針對 TeMV-CP 全長度核酸片段所構築之 pET-TeMVCP 選植株，於 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主內經由 IPTG 誘導大量表現蛋白，於 SDS-PAGE 電泳分析中可見 TeMV-CP 融合性蛋白之分子量大約為 30.1 kDa，與預估值相符 (圖 3A)。於西方墨點法中，市售 *Potyvirus* 屬病毒的單株抗體可與 TeMV-CP 融合性蛋白產生正反應 (圖 3C)，顯示 TeMV-CP 融合性蛋白具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性；以 TeMV-CP 融合性蛋白為抗原所製備之多元抗體，可與其同源的 TeMV-CP 融合性蛋白產生正反應 (圖 3B)；也可於 indirect ELISA 法中與下列樣品產生正反應 (表 2)，包括 (1) 同源之 TeMV-CP 融合性蛋白；(2) TeMV-DC6 等 9 個台灣百香果 TeMV 罹病組織；(3) 記錄上可感染百香果之其他種 potyviruses 包括 EAPV、CABMV、BYMV 及 SMV；(4) 以及其他受測試之不同 potyviruses 等。

泰國百香果病毒分離株之檢測效果

由泰國採樣之百香果葉片嵌紋或果實木質化徵狀之罹病組織樣品共 17 個，均與上述自製之 TeMV-DC6 多元抗體於 indirect ELISA 法中產生正反應讀值，A_{405nm} 之讀值在 0.33–1.99 之間，且均可與 *Potyvirus* 簡併式引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 產生預估值 1.3 kbp 之核酸片段產物 (結果未出示)，此產物經由核苷酸定序鑑定結果均為 TeMV 之成員 (表 3)。

上述免疫檢測結果，顯示本研究所製備之 TeMV-CP 多元抗體可應用於田間百香果 TeMV 罹病組織之檢測。但由於其可檢出其他種 potyviruses，顯示此多元抗體於 indirect ELISA 法中尚無法專一性地檢測 TeMV。

TeMV-DC6 分離株之全長度基因體核酸序列分析

以 DC6 分離株之百香果罹病葉片純化之

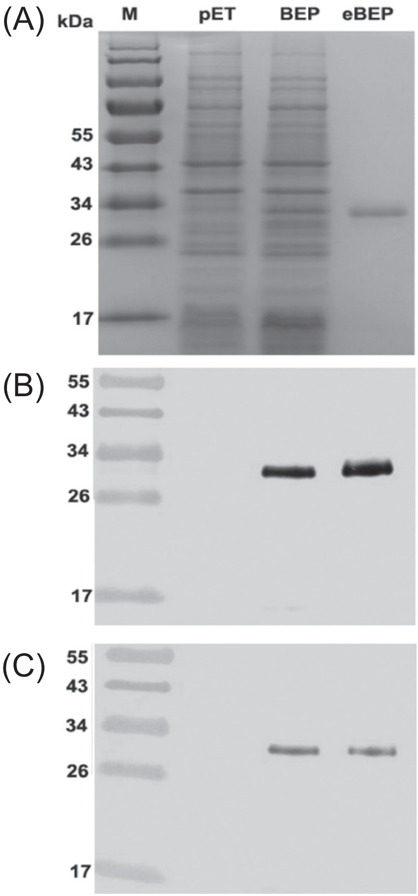


圖 3. 應用細菌大量表現的 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) TeMV 融合性表現蛋白 (30.1 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) 自製之 TeMV-CP 多元抗體、(C) Agdia 公司出品之 *Potyvirus* 單株抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28a (+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of *Telosma mosaic virus* (TeMV). (A) A 30.1 kDa bacterial-expressed fusion protein of TeMV-CP (lane eBEP) was observed in the SDS-PAGE assay. (B) The polyclonal antibody of TeMV-CP prepared in this study, and (C) the purchased monoclonal antibody of *Potyvirus* from Agdia were used to react with the bacterial-expressed TeMV-CP. Lane M, protein markers; lane pET, IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28a(+) without TeMV-CP insert; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with TeMV-CP insert; and lane eBEP, the purified bacterial-expressed TeMV-CP.

全量核酸為模板，先以 HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$ 引子對進行 RT-PCR，於電泳分析中獲得與預估值相符合約 1.3 kbp 核酸片段，經選殖與定序後確定有一個轉譯架構 (open reading frame)，且與首次報導百香果上之 TeMV (AM409188) (Chiemsombat *et al*. 2014) 其核苷酸與胺基酸之相同度分別為 91.4% 和 93.8%。依據國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 所公布的 *Potyvirus* 屬病毒分類標準 (https://talk.ictvonline.org/)，應屬相同病毒種之不同株系 (Van Regenmortel *et al*. 2000; Adams *et al*. 2005)。進一步就 DC6 分離株全長度核酸序列定序，在不採計 5' 端由簡併式引子 5'Te11u 序列之黏合處 18 個核苷酸後，共解得 10,022 個核苷酸，已登錄於 GenBank 取得登錄序號為 MN316594。

分析所解得的 10,022 個核苷酸序列之 TeMV-DC6 分離株基因體結構，其包含有部分的 5' 端非轉譯區 (5'-untranslatable region, 5'-UTR) 249 個核苷酸和 3'-NTR 的 254 個核苷酸；含有一個大蛋白轉譯架構，蛋白轉譯起始位置為核苷酸 AUG，由 9,519 個核苷酸對應產生一條含 3,173 個胺基酸的大蛋白；對應不同功能蛋白之核酸序列長度 (核苷酸/胺基酸) 分別為：P1 蛋白 (1224/408)、HC-Pro 蛋白 (1371/457)、P3 蛋白 (1041/347)、6k1 蛋白 (156/52)、CI 蛋白 (1902/634)、6k2 蛋白 (159/53)、NIa-VPg 蛋白 (570/190)、NIa-Pro 蛋白 (729/243)、NIb 蛋白 (1551/517)、CP 蛋白 (816/272)。因此，對應 CP 有 816 個核苷酸，可轉譯出 272 個胺基酸，預估 CP 分子量約為 29.9 kDa，CP 起始位置後第 8–10 個胺基酸為 DAG，為 *Potyvirus* 屬病毒可被蚜蟲傳播之分子證據 (Atreya *et al*. 1991)。

比較 TeMV-DC6 分離株之大蛋白胺基酸序列與 GenBank 上已登錄具有全長度大蛋白胺基酸之 TeMV 病毒株，包括中國大陸學者發表之百香果 TeMV-PasFru 分離株 (MG944249) (Yang *et al*. 2018) 和越南學者發表可感染夜香花 (*Telosma cordato*) 之 TeMV-Hanoi 分離株 (NC_009742) (Ha *et al*. 2008)，TeMV-DC6 大蛋白胺基酸與此 2 個 TeMV 分離株之相同度分別為 97.2% 和 80.2%，顯示其與百香果來源的分離株有較高的相同度。

依據 *Potyvirus* 屬病毒胺基酸序列特性歸納 (Ward *et al*. 1992; Adams *et al*. 2005)，本研究所解得之 TeMV-DC6 分離株基因體對應的蛋白分解酶辨識位址 (protease recognition site)，分別是：P1 protease 為 VHHY/S、HC-Pro protease 為 YRVG/G。NIa protease 於 P3/6k1、6k1/CIP 及 CIP/6k2 之辨識位址分別為 VKTQ/G、VRLQ/S 及 VRLQ/S；於 6k2/VPg、VPg/NIa、NIa/NIb 及 NIb/CP 之辨識位址分別為 VSTQ/G、VKVE/S、VKTQ/S 及 VSLQ/S。TeMV-DC6 之大蛋白在各個不同功能蛋白之切位辨識位址，與中國大陸發表感染百香果之 TeMV-PasFru 分離株 (MG944249) (Yang *et al*. 2018) 完全相同，而與越南發表感染夜香花之 TeMV-Hanoi 分離株 (NC_009742) (Ha *et al*. 2008) 於 P3/6k1 (VTTQ/G)、6k1/CIP (VRAQ/S) 和 VPg/NIa (VTTE/S) 有差異。

台灣和泰國 TeMV 分離株之 CP 核酸序列分析

比對分析的 9 個台灣 TeMV 分離株，分別採集自南投埔里的大坪頂 (DC3、DC4、DC6 和 DC33)、台中市后里區 (LSS18 和 LSS30) 與霧峰區 (WFS1、WFS2、WFS4)。表 3 所列之台灣 TeMV 分離株之 CP 核苷酸和胺基酸序列，與 2014 年泰國學者首次發表之百香果 TeMV-Pangda15 分離株序列 (GenBank acc. no. AM409188) (Chiemsombat *et al*. 2014) 相同度分別在 90.9–91.4% 和 93.0–93.8% 之間，屬相同的病毒種。由核酸檢測與定序分析等分子鑑定結果，顯示台灣上述地區之百香果已有 TeMV 感染。由泰國當地採集之 17 個百香果 TeMV 分離株，與泰國 TeMV-Pangda15 分離株之 CP 核苷酸和胺基酸序列亦有高相同度，分別為 87.0–93.6% 和 90.1–94.9% 之間 (表 3)。台灣和泰國所選殖之 TeMV 分離株核酸序列，均已登錄於 GenBank 取得序號 (表 3)。

專一性及廣效性引子對檢測台灣和泰國分離株之差異

依據台灣和泰國之 TeMV 分離株基因體 3' 端的核苷酸序列所設計的 3 組引子對，先行檢

測於 2017–2018 年由台灣所收集之 9 個已登錄於 GeBank 的分離株，以及由泰國收集之 17 個分離株 (表 3)，檢測結果顯示：(1) 以台灣分離株序列所設計的台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d)，可檢出所有受測的 9 個台灣 TeMV 罹病組織樣品，獲得預估值為 650 bp 的核酸片段產物 (圖 4)，但僅檢出 9 個泰國分離株 (圖 5、表 4)；(2) 以泰國分離株序列所設計的泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d)，完全無法檢出 9 個台灣分離株 (圖 4)，且僅可檢出 12 個泰國分離株 (圖 5、表 4)，但無法檢出的 5 個泰國分離株 (TL5、TL6、TL7、TL14 和 TL15)，可被台灣引子對檢出 (圖 5)；(3) 由台灣和泰國分離株序列比對後所設計的台灣泰國引子對 (TwTha840u/TwTha840d)，可檢出所有受測試的台灣和泰國分離株，且獲得預估值為 840 bp 的核酸片段產物 (圖 4、圖 5、表 4)；大部分樣品也會同時增幅出大小約 250 bp 的核酸片段產物 (圖 4、圖 5)，此片段經由定序結果確認乃對應 TeMV 之 Nuclear inclusion protein b (NIb)-C 端到 CP-N 端核甘酸的序列。

本試驗中顯示，單獨以台灣引子對或泰國引子對並無法完全檢出受測試之 17 個泰國百香果 TeMV 樣品 (圖 5)，且泰國引子對也無法

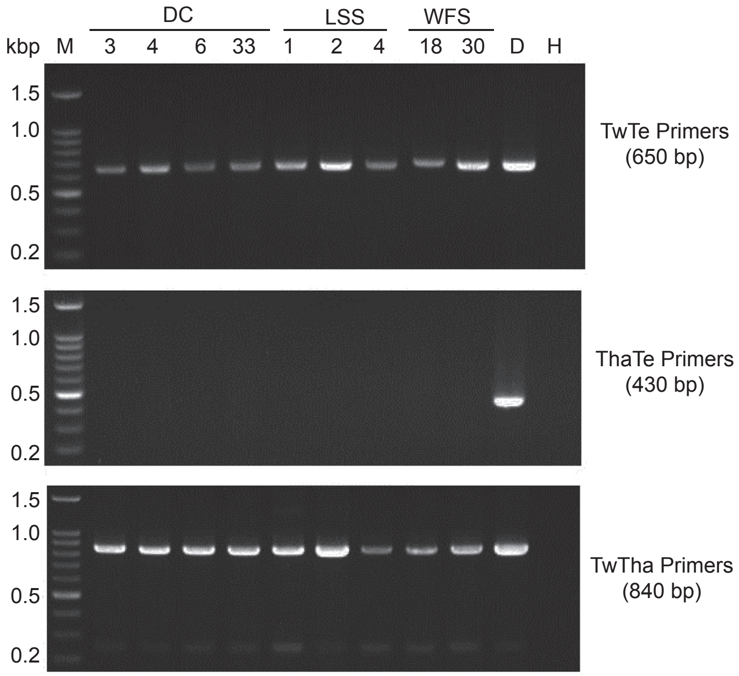


圖 4.　應用 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 專一性和廣效性引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢測台灣來源的百香果 TeMV 分離株之檢測效果。以專一性引子對 (TwTe: TwTe650u/TwTe650d 和 ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) 和廣效性引子對 (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) 增幅出之 TeMV 核酸片段產物大小，預估分別為 650 bp、430 bp 和 840 bp。行 M：100 bp DNA 標準標幟。行 DC、LSS 和 WFS：台灣不同地點之百香果罹病組織 (DC 埔里大坪頂、LSS 后里區、WFS 霧峰區)；行 D：百香果 TeMV 罹病組織正對照；行 H：健康百香果組織。

Fig. 4.　Efficacy of the designed *Telosma mosaic virus* (TeMV)-specific primer sets (TwTe: TwTe650u/TwTe650d and ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) as well as the TeMV-general primer set (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detecting TeMV-infected passiflora samples collected from various locations in Taiwan. The expected size of amplified cDNA of each primer sets, i.e., TwTe, ThaTe and TwTha, are 650, 430 and 840 bp, respectively. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker. Samples of lanes DC, LSS and WFS: TeMV isolates collected from various locations in Taiwan (DC, Nantou Puli; LSS, Houli Dist.; WFS, Wufeng Dist.); Lane D: TeMV-infected passiflora control; and Lane H: healthy passiflora.

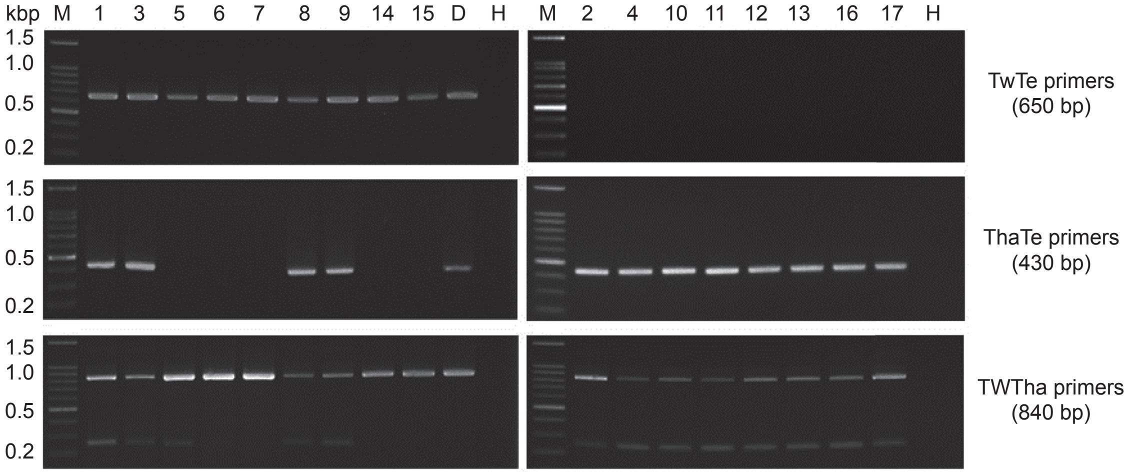


圖 5. 應用 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 專一性和廣效性引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢測泰國來源的百香果 TeMV 分離株之檢測效果。以專一性引子對 (TwTe: TwTe650u/TwTe650d 和 ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) 和廣效性引子對 (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) 增幅出之 TeMV 核酸片段產物大小，預估分別為 650 bp、430 bp 和 840 bp。行 M：100 bp DNA 標準標幟。行 1–17：泰國不同地點 (曼谷、清邁、清萊) 之百香果罹病組織；行 D：TeMV 罹病組織正對照；行 H：健康百香果組織。

Fig. 5. Efficacy of the designed *Telosma mosaic virus* (TeMV)-specific primer sets (TwTe: TwTe650u/TwTe650d and ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) as well as the TeMV-general primer set (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detecting TeMV-infected passiflora samples collected from various locations in Thailand. The expected size of amplified cDNA of each primer sets, i.e., TwTe, Thate and TwTha, are 650, 430 and 840 bp, respectively. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker. Samples of lanes 1–17: TeMV isolates from Bangkok, Chiang Mai and Chiang Rai in Thailand; Lane D: TeMV-infected passiflora control; and Lane H: healthy passiflora.

完全檢出受測試之 9 個台灣 TeMV 樣品 (圖 4)，而 TwTha840u/TwTha840d 引子對具有廣效檢出台灣和泰國兩地 TeMV 分離株之效果。

台灣和泰國 TeMV 分離株之類緣關係分析

由台灣和泰國所獲得之百香果不同 TeMV 分離株，以其全長度 CP 之胺基酸序列進行比對及分析類緣關係。由胺基酸類緣分析結果顯示 (圖 6)：(1) 本研究由台灣分離之 TeMV-DC6 等 9 個分離株，於 RT-PCR 檢測中均不與泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 反應產生 430 kbp 產物外，且在類緣上自成一分類群而與所有受測之泰國分離株有所區隔；(2) 本研究採集之 17 個泰國分離株中若可與泰國引子對反應，但無法與台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d) 反應者 (TL2、TL4、TL10、TL11、TL12、TL16 及 TL17) (圖 5)，則有自成一相近的分類群之趨勢 (圖 6)，此一分群中僅有 TL1 可與台灣引子對產生 650 kbp 片段 (圖 5)；(3) 泰國引子對無法檢出，但台灣引子對可檢出之泰國 TeMV 分離株 (TL5、TL6、TL7、TL14 和 L15) (圖 5)，則類緣上與台灣群較為接近 (圖 6) 但仍有區隔性。

以上結果，顯示台灣和泰國不同地理位置所分離到的百香果 TeMV 分離株在演化上具有類緣差異性；而 2014 年泰國學者首次發表之百香果 TeMV-Pangda 15 分離株序列 (AM409188) (Chiemsombat *et al*. 2014) 則與本試驗所採用之台灣和泰國 TeMV 分離株之類緣關係較遠 (圖 6)。

台灣和泰國 TeMV 分離株之 3 組引子對檢測田間百香果大量罹病樣品之鑑定效果

2017–2019 年期間，陸續於台灣的南投縣埔里大坪頂地區、台中市后里區和霧峰區田間所栽植之百香果進行 TeMV 發生調查，獲得可與 TeMV-CP 多元抗體產生正反應者。進一步利用 TeMV 台灣引子對 (TwTe650u/

表 4.　應用專一性和廣效性引子於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應檢測台灣和泰國田間百香果罹染 *Telosma mosaic virus* 效果之比較。

Table 4. Efficacy comparison of the designed *Telosma mosaic virus* (TeMV)-specific and TeMV-general primer sets in reverse transcription-polymerase chain reaction detecting TeMV-infected passiflora samples collected from Taiwan and Thailand.

		No. of samples positively detected in RT-PCR by[z]		
Field	Sample no.	TwTe primers (650 bp)	ThaTe primers (430 bp)	TwTha primers (840 bp)
Taiwan				
1	12	12	0	12
2	3	3	0	3
3	7	7	0	7
4	4	4	0	4
5	4	4	0	4
6	1	1	0	1
7	3	3	0	3
8	10	10	0	10
9	5	5	0	5
10	4	4	0	4
11	5	5	0	5
Total	**58**	**58**	**0**	**58**
Thailand				
Bangkok	12	9	7	12
Chiang Mai	3	0	3	3
Chiang Rai	2	0	2	2
Total	**17**	**9**	**12**	**17**

[z] Taiwan primers (TwTe, TwTe650u/TwTe650d) and Thailand primers (ThaTe, ThaTe430u/ThaTe430d) are specific primer sets while the Taiwan-Thailand primers (TwTha, TwTha840u/TwTha840d) are general primer set for detecting TeMV-infected *Passiflora* samples. The size of predicted cDNA fragments are 650, 430, and 840 base pairs for the primers Taiwan, Thailand, and Taiwan-Thailand, respectively.

TwTe650d) 以 RT-PCR 法鑑定確認，於 2017 年 11 月至 2018 年期間，由上述各地調查 22 個田區共 218 個百香果罹染病毒而葉片嵌紋病徵樣品，其中 70 個樣品有檢出 TeMV，獲得 TeMV 檢出率約 32.1% (結果未出示)；2019 年 6–8 月期間調查 18 個田區共 162 個百香果樣品，其中 11 個田區合計 58 個樣品有檢出 TeMV，獲得 TeMV 檢出率約 35.8% (結果未出示)。

進一步將 2019 年由台灣田間檢出 TeMV 罹病樣品共 58 個，以 3 組引子對進行 RT-PCR 鑑定檢測。以泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 均無法檢出此等台灣的 TeMV 罹病樣品；而台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d)、台灣泰國的廣效性引子對 (TwTha840u/TwTha840d) 均可檢出此受測的 58 個樣品 (表 4)。以上顯示，台灣泰國引子對 TwTha840u/TwTha840d 具有廣效性檢出台灣和泰國兩地 TeMV 分離株之效果。此外，泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 目前均法檢出由台灣分離到的 TeMV 分離株。因此，搭配 3 組引子對的檢測方式，可應用於台灣分離株之鑑別性檢測之判斷。

討論

本研究為台灣首度完成可實用於免疫檢測之百香果 TeMV-CP 多元抗體製備，台灣分離株 TeMV-DC6 之全長度基因體解序與鑑定，並釐清台灣與泰國 TeMV 分離株之類緣關係與 RT-PCR 分子檢測之差異性。同時設計可

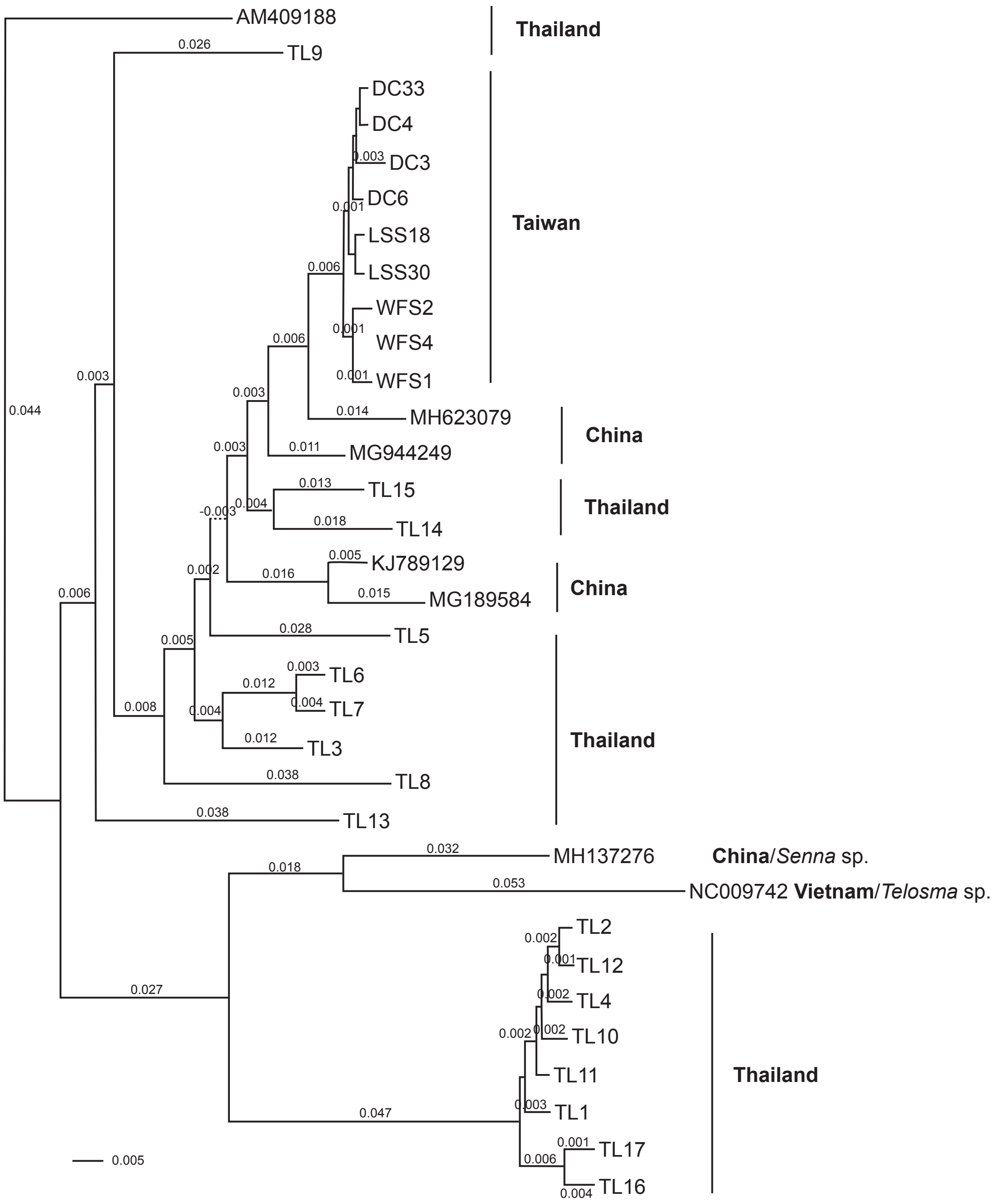


圖 6. 台灣和泰國之 *Telosma mosaic virus* 百香果分離株之類緣關係圖。

Fig. 6. A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of the coat proteins of different isolates of *Telosma mosaic virus* infecting *Passiflora* sp. from Taiwan, Thailand and those are available in GenBank. The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithm with the bootstrap resampling method (1,000 random resamplings), using PAUP 4.0. Numbers at each node indicate the substitutions of bootstrap samples. Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 5 substitutions per 1,000 amino acid positions. Isolates available in GenBank from *Senna alata* L. and *Telosma cordata* were the accession no. of MH137276 and NC_009742, respectively.

於 RT-PCR 法中廣效性檢出台灣和泰國百香果 TeMV 分離株之引子對，對於掌握近年發生於泰國和台灣之百香果 TeMV 病毒，具有建立病毒鑑定技術之效益。

TeMV 於 2014 年被泰國學者發現可感染百香果而引起果實木質化 (Chiemsombat *et al*. 2014)，然而在 2016 年當時國內尚未發現此病毒前，以國外已發生之 TeMV-CP 基因序列合成方式，建立本病毒之核酸正對照品，並據以誘導表現 CP 作為抗原而成功製備出本病毒之多元抗體。此種在未能取得特定病毒罹病植物組織檢體下，透過基因合成技術進行病毒核苷酸序列之人工合成，以及利用表現載體之細菌生合成系統獲得病毒鞘蛋白抗原，突破無法取得病毒材料之瓶頸，而成功製備出可有效檢測特定病毒之多元抗體與正對照品，進而掌握對特定病毒之檢測鑑定能力，此策略以往也見諸對台灣尚未發生之蘭花病毒 *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) 之檢測試劑製備 (Chen & Chiang 2017)。再度印證此策略可應用於檢測國內尚未發生之重要作物病毒，藉此可事先建立實用之病毒檢測試劑，達到強化國內自主檢疫監測重要作物病毒能力的目標。

病毒多元抗體使用於免疫反應中容易產生非專一性的結果 (Shukla *et al*. 1988; Jordan & Hammond 1991)，乃因抗原免疫過程中，因為所對應同一分子的不同抗原決定基 (antigenic determinants) 而產生 (Souiri *et al*. 2014)；尤其以全長度 CP 為抗原所製備出的多元抗體，更容易導致對特定病毒的非專一性反應 (Shepard *et al*. 1974; Shukla *et al*. 1989)。本研究所製備之 TeMV-CP 多元抗體，於 indirect ELISA 法中，除對 TeMV 反應，同時可檢出同屬 *Potyvirus* 之百香果病毒包括 EAPV、CABMV、BYMV 和 SMV (表 2)。因此，就廣效性檢測而言，此 TeMV-CP 多元抗體可發揮對百香果上不同 potyviruses 之篩檢效益，惟須配合 RT-PCR 法輔助免疫檢測之鑑定，以能更精準地檢測與診斷百香果上的 TeMV。

TeMV 為引起百香果木質化病徵的病毒之一，影響百香果之果品品質 (Chiemsombat *et al*. 2014; Xie *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018c)。本研究於泰國曼谷、清邁和清萊等地所採集之嵌紋葉片或木質化果實樣品，均只檢出 TeMV。顯見 TeMV 單獨感染可造成明顯的果實木質化徵狀 (圖 1C–1D、圖 1E–1F)，此與 2014 年泰國學者首次證實 TeMV 可引起百香果實之木質化之結果相符 (Chiemsombat *et al*. 2014)。由本研究結果推測，TeMV 為泰國當地引起果實木質化的主要病毒種類，不同於台灣引起百香果木質化之病毒主要為 EAPV (Chang 1992; Chong *et al*. 2018)。

作者於 2017 年底首度鑑定 TeMV 在台灣百香果上發生，同時期國內多篇報告確認此病毒之發生 (Tsai *et al*. 2018)。由 2017–2019 年期間於台灣田間百香果產地的調查結果顯示，TeMV 的檢出率大約在 32.1–35.8%，顯示本病毒已存在台灣田間，但仍為零星發生於不同田區狀態。基於 TeMV 已被證實發生於台灣田間百香果，因此台灣百香果健康種苗生產之農政輔導單位，於 2018 年起針對百香果種苗繁殖用母本株增加對 TeMV 之監測，以確保台灣產百香果種苗之健康品質。

本研究於台灣田間檢出 TeMV 之樣品，植株葉片均呈現嵌紋徵狀且大多與 EAPV 複合感染，其中僅單獨檢出 TeMV 的 2 個田間樣品，觀察亦可見其葉片嵌紋和果實呈現濃綠不均的木質化徵狀 (圖 1A)。由 TeMV-DC6 分離株於溫室接種百香果試驗結果，亦顯示其可引起明顯的葉片嵌紋徵狀 (圖 1B) (Chen *et al*. 2018a)，待後續接種病毒之植株開花結果後，能更明確地確認造成的果實病徵。

將田間百香果所收集之 9 個 TeMV 台灣分離株，與由泰國百香果所獲得之 17 個分離株進行類緣分析比對，顯示台灣和泰國的 TeMV 分屬於不同的類緣群。在核酸分子檢測上，可用不同引子對以 RT-PCR 檢測區分不同類緣群病毒 (圖 4)，以台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d) 可有效檢出台灣分離株，而泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 則全部無法檢出 (圖 4、表 4)。若以泰國引子對搭配台灣泰國的廣效性引子對 (TwTha840u/TwTha840d)，則可就 RT-PCR 法區別台灣分離株。然實際的台灣 - 泰國分離株差異性，須以 TeMV-CP 的胺基酸序列做類緣關係分析才能確認分離株的地緣分類 (圖 6)，或採用核酸序列比對做分類

依據，可獲得較穩定而正確的鑑定結果 (Ward *et al*. 1992; Adams *et al*. 2005; Gibbs & Oshima 2010)。

台灣和泰國 TeMV 分離株具有演化上的類緣差異性 (圖 6)，且於 RT-PCR 檢測法中顯示以泰國 TeMV 引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 並無法檢出所有測試的 9 個台灣分離株 (圖 4) 和台灣田間的 58 個 TeMV 罹病樣品 (表 4)，更加證實此二地理位置之百香果 TeMV 的分子差異性。近來中國大陸學者也發現 TeMV 分離株分類群依寄主不同而有分別，來自同一寄主之 TeMV 分離株則屬相同分類群 (Xie *et al*. 2017)。同一種病毒因地理分布位置或不同寄主來源而產生演化分類上的類緣分群現象，已見諸 TuMV (Ohshima *et al*. 2002; Tomimura *et al*. 2003; Gibbs & Ohshima 2010) 和 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) (Chen *et al*. 2018b) 等 *Potyvirus* 病毒報告。

目前已有紀錄之 TeMV 全長度核苷酸序列，包括中國大陸之百香果 TeMV-PasFru 分離株 (Acc. no. MG944249) (Yang *et al*. 2018) 和越南之夜香花 TeMV-Hanoi 分離株 (Acc. no. NC_009742) (Ha *et al*. 2008)；本研究之 TeMV-DC6 分離株與同為百香果上之 TeMV-PasFru 分離株之大蛋白胺基酸序列相同度高達 97.2%，在各個不同功能蛋白之切位辨識位址完全相同，但與越南發表之夜香花 TeMV-Hanoi 分離株之相同度 80.2%，且蛋白酶辨識切位於 P3/6k1 (VTTQ/G)、6k1/CIP (VRAQ/S) 和 VPg/NIa (VTTE/S) 有差異，進一步說明百香果寄主來源之 TeMV 有較高的同源性的結論。

台灣生產之百香果種苗已有輸出東南亞國家 (主要為越南和泰國)，且於泰國已有發生 TeMV 之紀錄。本研究研發鑑別台灣分離株之分子鑑定法，以及由廣效性檢出台灣和泰國 TeMV 的檢測技術，將可應用於種苗輸出國外後，區分發生病毒病病原來源之爭議。台灣目前力行的百香果健康種苗生產體系及田間生產採用每年更新換植的一年生栽培技術，為台灣百香果產業能持續領先亞洲各國的關鍵技術。面對未來，持續保持健康種苗的內控品質要求，相信是台灣百香果產業在亞洲地區日益競爭的種苗市場中，持續居優勢地位的重要立基。本研究所開發之 TeMV 多元抗體及 3 組核酸檢測用引子對之應用，除了促使國內對百香果病毒診斷鑑定之檢測試劑更臻完備外，並能應用於提升台灣對 TeMV 的自主檢測與鑑定能力，尤其對於有類緣差異性的台灣和泰國 TeMV 分離株，本研究已開發的引子對可提升檢出不同來源 TeMV 的正確度與鑑定效益。

誌謝

本試驗承本組病毒研究室助理黃美容小姐協助多元抗體檢測試驗，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 2017 年百香果重要病毒檢測試劑套組開發應用計畫 [106 農科-9.4.1-檢-B3(1)] 和行政院農業委員會 2018 年度農業研發成果跨域整合創新加值與產業化應用計畫 (MOST 107-3111-Y-067E-016) 之經費補助，謹此一併致謝。

引用文獻

Adams, M. J., J. F. Antoniw, and C. M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Arch. Virol. 150:459–479.

Atreya, P. L., C. D. Atreya, and T. P. Pirone. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in the loss of insect transmissibility of a plant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:7887–7891.

Baker, C. A., A. Jeyaprakash, C. G. Webster, and S. Adkins. 2014. Viruses infecting *Passiflora* species in Florida. Plant Pathol. Circ. 415. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, FL. https://www.fdacs.gov/content/download/40511/file/ppcirc415.pdf (visit on 08/22/2019)

Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. Phytopathology 82:1358–1363.

Chang, C. A., E. Hiebert, and D. E. Purcifull. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyvirus. Phytopathology 78:1266–1275.

Chang, C. A., L. C. Huang, Y. C. Chen, Y. Y. Lin, H. C. Lu, and Y. D. Lin. 2017. A review of the research and control of passionfruit virus diseases in Taiwan. J. Plant Med. 59:1–12.

Chang, C. A. and H. H. Lin. 1989. Passionfruit crinkle virius, a new potyvirus isolated from passionfruit in Taiwan. Plant Prot. Bull. 31:409–410.

Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Bot. Stud. 47:369–378.

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2017. Development and application of the molecular and serological detection methods for *Cymbidium ringspot virus*. J. Taiwan Agric. Res. 66:202–218. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., F. L. Chiang, C. M. Hsu, and M. R. Huang. 2018a. Development and application of nucleic acid detection technology for *East Asian passiflora virus* and *Telosma mosaic virus*. p.52. *in*: Proceeding of Annual Meeting of the Plant Protection Society of Republic of China. November 30, 2018. Taichung, Taiwan. The Plant Protection Society of Republic of China, Taichung. (in Chinese)

Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018b. Molecular and serological identification of Gloriosa strip mosaic virus on Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook). J. Taiwan Agric. Res. 67:229–246.

Chen, S. S., N. Yu, S. H. Yang, B. P. Zhong, and H. H. Lan. 2018c. Identification of Telosma mosaic virus infection in *Passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents. Virol. J. 15:168.

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, C. H. Chiang, and C. A. Chang. 2014. First report of *Euphorbia leaf curl virus* and *Papaya leaf curl Guangdong virus* on passion fruit in Taiwan. Plant Dis. 98:1746.

Chiemsombat, P., S. Prammanee, and N. Pipattanawong. 2014. Occurrence of *Telosma mosaic virus* causing passion fruit severe mosaic disease in Thailand and immunostrip test for rapid virus detection. Crop Prot. 63:41–47.

Chong, Y. H., Y. H. Cheng, H. W. Cheng, Y. C. Huang, and S. D. Yeh. 2018. The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as *East Asian passiflora virus*. J. Gen. Plant Pathol. 84:208–220.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Coutts, B. A., M. A. Kehoe, C. G. Webster, S. J. Wylie, and R. A. C. Jones. 2011. Indigenous and introduced potyviruses of legumes and *Passiflora* spp. from Australia: Biological properties and comparison of coat protein nucleotide sequences. Arch. Virol. 156:1757–1774.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791.

Fischer, I. H. and J. A. M. Rezende. 2008. Diseases of passion flower (*Passilora* spp.). Pest Tech. 2:1–19.

Fukumoto, T., M. Nakamura, M. Rikitake, and H. Iwai. 2012. Molecular characterization and specific detection of two genetically distinguishable strains of *East Asian Passiflora virus* (EAPV) and their distribution in southern Japan. Virus Genes 44:141–148.

Gibbs, A. and K. Ohshima. 2010. Potyviruses and the digital revolution. Annu. Rev. Phytopathol. 48:205–223.

Ha, C., S. Coombs, P. A. Revill, R. M. Harding, M. Vu, and J. L. Dale. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Arch. Virol. 153:25–36.

Iwai, H., R. Terahara, Y. Yamashita, S. Ueda, and M. Nakamura. 2006a. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-Shima strain of *East Asian Passiflora potyvirus*. Arch. Virol. 151:1457–1460.

Iwai, H., Y. Yamashita, N. Nishi, and M. Nakamura. 2006b. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species *East Asian Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. Arch. Virol. 151:811–818.

Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 72:25–36.

Kil, E. J., H. Seo, H. S. Byun, S. S. Suh, T. K. Lee, K. Y. Lee, J. H. Lee, J. K. Kim, S. J. Ko, H. S. Choi, C. S. Kim, and S. Lee. 2016. First report of *Euphorbia leaf curl virus* in passion fruits in South Korea and its natural occurrence in papaya. Plant Dis. 100: 865.

Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3’-terminal region of dasheen mosaic virus (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143:2461–2469.

Liberato, J. R. and F. M. Zerbini. 2019. Diseases of passionfruit (*Passiflora* spp.). https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Passion-fruit.aspx (visit on 02/26/2020)

Ma, X. Y., J. H. Cai, G. X. Li, B. X. Qin, and X. P. Zhou. 2004. Molecular characterization of a distinct *Begomovirus* infecting *Euphorbia pulcherrima* in China.

J. Phytopathology 152:215–218.

Nascimento, A. V. S., E. N. Santana, A. S. K. Braz, P. F. Alfenas, G. Pio-Ribeiro, G. P. Andrade, M. G. de Carvalho, and F. M. Zerbini. 2006. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. Arch. Virol. 151:1797–1809.

Noveriza, R., G. Suastika, S. H. Hidayat, and U. Kartosuwondo. 2012. *Potyvirus* associated with mosaic disease on patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] plants in Indonesia. J. ISSAAS 18:131–146.

Ohshima, K., Y. Yamaguchi, R. Hirota, T. Hamamoto, K. Tomimura, Z. Tan, T. Sano, F. Azuhata, J. A. Walsh, J. Fletcher, J. Chen, A. Gera, and A. Gibbs. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. J. Gen. Virol. 83:1511–1521.

Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121–1125.

Parrella, G. and C. Lanave. 2009. Identification of a new pathotype of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) infecting blue passion flower and some evolutionary characteristics of BYMV. Arch. Virol. 154:1689.

Shepard, J. F., G. A. Secor, and D. E. Purcifull. 1974. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. Virology 58:464–475.

Shukla, D. D., P. M. Strike, S. L. Tracy, K. H. Gough, and C. W. Ward. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. J. Gen. Virol. 69:1497–1508.

Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tosic, and R. E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polycional antibodies directed towards virus-specific N termini of coat proteins. J. Gen. Virol. 70:13–23.

Song, Y. S. and K. H. Ryu. 2011. The complete genome sequence and genome structure of passion fruit mosaic virus. Arch. Virol. 156:1093–1095.

Souiri, A., M. Zemzami, S. Amzazi, and M. M. Ennaji. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. Eur. J. Sci. Res. 123:281–295.

Spiegel, S., M. Zeidan, I. Sobolev, Y. Beckelman, V. Holdengreber, Y. Tam, M. Bar Joseph, Z. Lipsker, and A. Gera. 2007. The complete nucleotide sequence of Passiflora latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. Arch. Virol. 152:181–189.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: Flexibel strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25:4876–4882.

Tomimura, K., A. J. Gibbs, C. E. Jenner, J. A. Walsh, and K. Ohshima. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent “emergence” in east Asia. Mol. Ecol. 12:2099–2111.

Tsai, Y. T., Y. C. Chen, L. C. Huang, Y. K. Chen, and C. A. Chang. 2018. Isolation and Identification of *Telosma mosaic virus* on passionfruit in Taiwan. p.28. *in*: Proceeding of Annual Meeting of the Plant Protection Society of Republic of China. January 26, 2018. Taichung, Taiwan. The Plant Protection Society of Republic of China, Taichung. (in Chinese)

Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Farcquet, D. H. C. Bishop, E. B. Cartens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner. 2000. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press. San Diego, CA. 1162 pp.

Wang, X., Y. Xie, and X. Zhou. 2004. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. Virus Genes 29:303–309.

Ward, C. W., N. M. McKern, M. J. Frenkel, and D. D. Shukla. 1992. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. Arch. Virol. 5:283–297.

Wylie, S. J. and M. G. K. Jones. 2011. The complete genome sequence of a *Passion fruit woodiness virus* isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. Arch. Virol. 156:479–482.

Xie, L. X., X. Y. Zhang, S. Zheng, L. J. Zhang, and T. Li. 2017. Molecular identification and specific detection of *Telosma mosaic virus* infecting passion fruit. Sci. Agric. Sin. 50:4725–4734.

Yang, K., H. Yan, L. Song, P. Jin, W. Miao, and H. Cui. 2018. Analysis of the complete genome sequence of a potyvirus from passion fruit suggests its taxonomic classification as a member of a new species. Arch. Virol. 163: 2583–2586.

Yao, L. Z., X. Q. Li, J. G. Wang, S. Y. Chen, and X. J. Wang. 2019. First report of *Telosma mosaic virus* infecting Emperor’s candlesticks (*Senna alata*) in China. Plant Dis. 103:594.

Molecular Characterization of the *Telosma mosaic virus* Passionfruit Isolates and the Development and Application of Its Wide-Spectrum Molecular Detection Techniques

Wen-Li Lee[1], Chinnapan Thanarut[2], Chih-Cheng Hsu[3], Guo-Chi Lee[4], Fen-Lang Chiang[5], and Chin-Chih Chen[6,*]

Abstract

W. L., Lee, Chinnapan Thanarut, C. C., Hsu, G. C., Lee, F. L., Chiang, and C. C., Chen. 2020. Molecular characterization of the *Telosma mosaic virus* passionfruit isolates and the development and application of its wide-spectrum molecular detection techniques. J. Taiwan Agric. Res. 69(1):46–64.

In this study, a polyclonal antibody against *Telosma mosaic virus* (Ab-TeMV) was prepared from the bacteria expressed TeMV coat protein gene. Ab-TeMV had a broad-spectrum detection efficiency for the potyviruses of TeMV, *East Asian passiflora virus* (EAPV), *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CAB-MV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Soybean mosaic virus* (SMV). The full-length genomic nucleotide sequences of TeMV-DC6, an isolate infecting passiflora in Taiwan, was determined (GenBank accession number MN316594). The incidence of TeMV on passiflora in fields of Taiwan during 2017–2019 was 32.1 to 35.8% by serological and molecular detection reagents of TeMV prepared in this study. Moreover, only TeMV was positively detected from those 17 virus-infected passiflora samples (showed symptoms of leaf mosaic and woodiness fruit) collected from Thailand. The CP amino acid sequences of those TeMV isolates collected from Taiwan and Thailand's passifloa fields shared higer than 90% identities with that of the known TeMV (AM409188) in GenBank. However, the phylogenetic analysis indicated that TeMV isolates of passiflora from different geographical locations are different in phylogenetic evolution, because 9 Taiwan isolates are closely related and separated from those 17 Thailand isolates. Three sets of primer pairs were designed based on the aligned nucleotide sequences of Taiwan and Thailand TeMVs, and used in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Among the 67 Taiwan isolates and 17 Thailand isolates, the Taiwan primer pair (TwTe650u/TwTe650d) can amplify the expected amplicons from all of the tested Taiwan isolates and 9 out of the 17 Thailand isolates. The Thailand primer pair (ThaTe430u/ThaTe430d) only detected 12 out of the 17 Thailand isolates and could not detect all of the Taiwan isolates. The Taiwan-Thailand primer pair (TwTha840u/TwTha840d) could detect all of the tested isolates. In this report, the incidences of TeMV in Taiwan and Thailand were clarified and the full-length genomic sequence of Taiwan isolate DC6 was first completed. The phylogenetic differences between Taiwan and Thailand TeMV isolates were demonstrated, and the primer pairs were developed for the wide-spectrum detection of those passiflora TeMV isolates in Taiwan and Thailand to improve the detection efficacy of TeMV.

Key words: *Passiflora* sp., *Telosma mosaic virus* (TeMV), Polyclonal antibody, Full-length sequence, Broad-spectrum detection by RT-PCR.

Received: September 7, 2019; Accepted: October 24, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw
[1] Research Fellow and Director, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[2] Instructor, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, Thailand.
[3] Assistant Research Fellow, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[4] Chief, Technology Service Section, Department of Science and Technology, Council of Agriculture, Taipei, Taiwan, ROC.
[5] Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[6] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):65–76 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0005

研究報告

由 *Fusarium oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病

黃巧雯[1] 黃晉興[2,*] 李怡靜[3] 陳純葳[4] 謝廷芳[5]

摘要

黃巧雯、黃晉興、李怡靜、陳純葳、謝廷芳。2020。由 *Fusarium oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病。台灣農業研究 69(1):65–76。

假球莖腐敗病 (pseudobulb rot) 為小花蕙蘭生產過程中重要病害之一。受害植株初期下位葉片失去光澤、失水，爾後呈現黃化、萎凋狀。當葉片整片褐化後易抽起與葉鞘分離，只遺留假球莖及殘留之葉基部，最後造成植株死亡，剖開罹病植株可見假球莖與連接根部組織呈黑褐化腐敗病徵。由罹病組織可穩定分離到一種鐮孢菌，該類鐮孢菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA)。於室溫 25–30℃、光照環境下，其培養菌落形態可區分為兩型 (type)，type-I 菌株之菌落為淡紫色，而 type-II 菌株之菌落為土黃色。依據病原菌形態特徵及分子序列鑑定結果，此兩型的鐮孢菌皆被鑑定為 *Fusarium oxysporum*。此兩型的病原菌，皆可造成蕙蘭屬中報歲蘭與四季蘭之假球莖與根部黑褐色腐敗。此兩型的病原菌菌絲生長溫度範圍為 16–32℃，最適溫度為 24–28℃；孢子發芽溫度範圍為 16–36℃，最適溫度為 24–36℃；最適本病害發生溫度為 25–30℃。此兩型的病原菌不僅危害報歲蘭與四季蘭外，亦可在虎頭蘭之假球莖上造成類似病徵，但在其他蘭花如文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭及石斛蘭植株上皆未見病徵產生。

關鍵詞：小花蕙蘭、假球莖腐敗病、鐮孢病菌。

前言

小花蕙蘭 (oriental cymbidium) 俗稱國蘭，是由蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 中的建蘭 (或稱四季蘭，*Cymbidium ensifolium*)、報歲蘭 (*Cymbidium sinense*)、春蘭 (*Cymbidium goeringii*)、寒蘭 (*Cymbidium kanran*) 及九華蘭 (*Cymbidium faberi*) 等植物所組合成的統稱。蕙蘭屬的學名由希臘字 kymbes (船) 而來，指花器中唇瓣 (lip) 好像船的形狀，為 1799 年即已設立的屬，包含 52 個種，分布範圍遍及東北亞、東亞、東南亞至澳洲北部，屬內植物可適應溫帶及熱帶環境，亦有附生型與地生型等多種類。蕙蘭屬植株主要由葉片 (leaf)、假球莖 (pseudobulb)、鞘葉 (sheath leaf) 及肥大的根 (root) 組成，假球莖是儲藏水分與養分的器官，在植株生育上及開花上扮演著重要的關鍵性角色 (Tsai 1998; Du Puy & Cribb 2007; Hsu 2010)。小花蕙蘭原生地分布在中國、台灣、韓國及日本等地區，這類植株株型、花型較小，花朵直徑通常不超過 6 cm，與大花型的虎頭蘭外觀上明顯不同，其繁殖以組織培養苗與分株為主 (Hung *et al*. 2017)。目前在台灣所栽培的小花蕙蘭內銷較少，多以外銷為主，九成以上銷往韓國，其他國家如日本、香港及北美都有零星出口，近年來中國逐漸成為另一個重要外銷市場。目前台灣小花蕙蘭栽種面積約 70–100 ha，栽種地區以台中市東勢區、南投縣埔里鎮與魚池鄉、嘉義縣、高雄市及屏東縣等中南部為主 (Hung *et al*. 2010)。

台灣迄今正式記載之小花蕙蘭主要病害有

投稿日期：2019 年 8 月 19 日；接受日期：2019 年 10 月 25 日。

[*] 通訊作者：jhhuang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

由 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) 引起的蕙蘭嵌紋病毒病、由 *Odontoglossum rigspot virus* (ORSV) 引起的齒舌蘭輪斑病毒病；由 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 引起的細菌性軟腐病、由 *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* 引起的細菌性褐斑病；由 *Phytophthora palmivora*、*Phytophthora parasitica* 引起的疫病、由 *Botrytis cinerea* 引起的灰黴病、由 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的炭疽病、由 *Phyllosticta cymbidii* 引起的葉斑病。另外，亦有葉芽線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*、*Aphelenchoides bicaudatus*)、南方根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*)、根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 引起的線蟲病害 (Hsu *et al*. 2002)。在台灣，小花蕙蘭園區常見植株發生葉片黃化萎凋現象，當整片葉片褐化後易抽起與葉鞘分離，只遺留假球莖及殘留之葉基部；剖開罹病植株可見假球莖與連接根部組織黑化腐敗現象，藉由研究報告比對後發現可能為由 *F. oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病害 (pseudobulb rot) (Jee *et al*. 2003)。已知國外報告中 *F. oxysporum* 亦會引起小花蕙蘭莖腐、根腐及乾腐病徵 (stem rot, root rot, and dry rot) (Benyon *et al*. 1996; Kim *et al*. 2002a; Yao *et al*. 2018)。然而，在台灣未見上述有關由 *F. oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病相關正式研究報告，因此本研究針對小花蕙蘭假球莖腐敗病病徵表現、病原菌形態特徵、分子鑑定及病原菌生理特性進行瞭解，以期望能對本病害之診斷鑑定及防治有所助益。

材料與方法

病原菌分離與保存

將田間罹患假球莖腐敗病之小花蕙蘭植株攜回實驗室，直接將罹病植株之病健部組織，以 0.5% (v/v) 次氯酸鈉漂洗消毒 30 s，繼而以 75% (v/v) 酒精消毒 30 s，最後再以無菌水漂洗 2 次。自然風乾後，利用滅菌過之解剖刀切取病健部相鄰組織，置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上分離。將培養基置於室溫下 4–5 d，其分離所得之菌株置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 中純化後，待其產孢後進行單孢分離，並將其保存於 PDA 斜面培養基及無菌水保存管中，置於 10℃保存備用。本研究使用供試菌株來源，Fo-51 與 Fo-92 皆由南投縣魚池鄉之四季蘭罹病植株上所分離菌株。另外，Fo-50 與 Fo-72 則分別從台中市大甲區之四季蘭及台中市東勢區之報歲蘭罹病植株上所分離菌株。

病原菌形態及分子鑑定

將所純化之病原菌培養於 PDA 培養基上，置於 24℃黑暗培養 7 d 後觀察菌落形態。另外，再將本病原菌單孢後於 2% WA 上培養 5–7 d，以光學顯微鏡 (Leica DM 2500, Leica, Wetzlar, Germany) 進行孢子形態觀察，並以 NIS-Elements version 4.51 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 測量 50 個以上大小孢子、厚膜孢子之長度與寬度。再參考 Summerell *et al*. (2001) 及 Leslie *et al*. (2006) 所描述的鐮孢菌孢子著生方式與形態，鑑定所分離之鐮孢菌菌株。分子鑑定方式，則是刮取菌絲置於微量離心管中，加入 0.5 N NaOH 溶液，將菌絲磨碎後，以 28,500× *g* 離心 (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo, Waltham, MA, USA) 5 min 並吸取上清液。與 9× 體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 混合，直接吸取混合後之溶液。以 Taq DNA polymerase (protech) 聚合酶酵素進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，分別增幅 internal transcribed spacer (ITS) (White *et al*. 1990) 與 translation elongation factor 1 alpha (TEF-1la) 片段 (O'Donnell *et al*. 1998; Geiser *et al*. 2004)，增幅後產物委由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 進行定序。定序後之序列再與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上所登錄之資料庫進行菌株序列分析比對，並將該序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

小花蕙蘭假球莖腐敗病分離株之病原性測定

將由小花蕙蘭假球莖腐敗病組織分離 *F. oxysporum* type-I 之 Fo-51 與 type-II 之 Fo-92 分離株培養於 PDA 斜面，經 25℃、7 d 後，

以無菌水將 PDA 上所產生之孢子洗下，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Carlsbad, CA, USA) 計算孢子濃度。再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^6 spores mL^{-1})，供接種試驗用。購買市售報歲蘭與四季蘭植株，選取植株葉片、假球莖及根部部位，先以沾有 75% 酒精的棉花擦拭接種組織表面進行消毒，再以無菌之針頭於接種處上製造傷口。於上述已針刺製造傷口之葉片、假球莖及根部進行接種，每個接種處滴 500 μL 之孢子懸浮液，緩緩滴於傷口上。再利用透氣膠帶 (Nexcare, 3M micropore™, St. Paul, MN, USA) 密封傷口保濕，將接種後植株再使用透明塑膠袋密封保濕置於 25–30℃溫室中。接種後第 5 天，將透明膠袋移除，每個處理 4 重複，並以無菌水作為對照組，接種後每週觀察並記錄病徵發展情形。

小花蕙蘭假球莖腐敗病分離株對不同蘭花品種之病原性測定

供試蘭花品種計有報歲蘭 (*C. sinense*)、四季蘭 (*C. ensifolium*)、虎頭蘭 (*Cymbidium hookerianum*)、文心蘭 (*Oncidium flexuosum*)、仙履蘭 (*Paphiopedilum insigne*)、嘉德麗雅蘭 (*Cattleya*) 及石斛蘭 (*Dendrobium moniliforme*) 等 7 種不同蘭花品種。接種方式將 Fo-50、Fo-51、Fo-72 及 Fo-92 分離株以無菌水製成孢子懸浮液 (10^6 spores mL^{-1}) 供接種試驗用。將各品種蘭花植株以無菌針頭在球莖上製造傷口，並使用滅過菌剪刀剪部分根系後，浸泡於上述以無菌水配製孢子懸浮液中。約 10 min 後，再種植回內盛碎石之栽培盆中。爾後每盆再加入 10 mL 孢子懸浮液，每種蘭花品種處理 12 株，以無菌水作為對照組，分別放置於 25–30℃溫室內，每週觀察病徵進展情形，本試驗重複進行 2 次。

溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將 *F. oxysporum* type-I 之 Fo-51 與 type-II 之 Fo-92 分離株分別從保存管取出放置 PDA 平板，於室溫下培養約 5 d 後，待其產孢後進行單孢分離。於 PDA 平板上室溫培養 7 d 後，以滅菌過之打孔器 (直徑 0.6 cm) 切取菌絲邊緣，置於 PDA 平板中央。分別置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40℃之定溫箱中黑暗培養，培養後第 7 天測量其菌絲生長之直徑，每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。另外，取 *F. oxysporum* type-I 之 Fo-51 與 type-II 之 Fo-92 分離株於 PDA 平板上，培養約 7 d 待其產孢後，以無菌水配製約 10 spores μL^{-1} 之孢子懸浮液，並取 20 μL 孢子懸浮液滴於八孔載玻片上。將玻片保濕於玻璃培養皿中，分別靜置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40℃之定溫箱中。24 h 後取出於顯微鏡下觀察孢子發芽情形，每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。

溫度對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

供試植物來自市售之四季蘭與報歲蘭植株。將小花蕙蘭植株以無菌針頭在假球莖上製造傷口後，植株接種方式如上述，每個處理 4 盆。每盆放置於外圍頂端露空之塑膠套內，自頂端噴澆少許水以保濕，分別置於 15、20、25 及 30℃之生長箱栽培，以無菌水為對照組，每週觀察並記錄發病情形。病害發展之嚴重程度，則以罹病度 (disease severity) 表示，罹病度等級區分為 0–3 級：0 級為健全；1 級植株葉片末端失水；2 級為植株全葉失水；3 級為植株出現葉片失水黃化、枯死、假球莖腐敗。依下列公式計算罹病度：Disease severity (%) = $(n_0 \times 0 + n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3)/N \times 3 \times 100\%$，$n_i$ 為 i 級之調查棵數，N 為調查總棵數，本試驗重複 2 次。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS Enterprise Guide 7.1 版統計分析軟體，先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

結果

小花蕙蘭假球莖腐敗病之病徵

本研究在台灣之小花蕙蘭園區陸續有假球

莖腐敗病的發生，假球莖腐敗病病徵為初期時植株下位葉片失去光澤且呈現輕微失水狀，爾後葉片基部會由下往上出現黑褐化現象。隨後葉片黃化或未黃化即從葉基部斷落，最後整株小花蕙蘭葉片完全斷落，只遺留假球莖及殘留之葉基部 (圖 1C–D)。病害發生整個過程在夏季約 1–3 個月，冬季則可達半年以上；若幼芽感染則會發現葉基部黑褐化並迅速往上蔓延，幼芽通常容易抽起與葉鞘分離。剖開罹病植株，可見假球莖與接連根部呈黑褐化腐敗現象 (圖 1)。另外，本研究於田間採樣及分離，結果顯示 type-I 型菌株其分離率高達 95%，而 type-II 型菌株其分離率則為 5%。

小花蕙蘭假球莖腐敗病菌之培養形態與分子鑑定

經單孢培養於 PDA 平板之小花蕙蘭假球莖腐敗病菌，其培養菌落形態可區分為兩型 (type)。type-I 菌株之菌落為淡紫紅色略帶白色、菌絲綿密生長，孢子叢 (sporodochia) 呈淡紫紅色 (圖 2A)。type-II 菌株之菌落，則為淡土黃色略帶白色、菌絲放射狀生長，孢子叢呈土黃色 (圖 2G)。type-I 與 type-II 分別以 Fo-51 與 Fo-92 分離株作為代表菌株。利用滅菌後之針頭沾取各菌落後，透過光學顯微鏡可觀察到孢子形態，如圖 2B–2F [type-I (Fo-51)]、2H–2K [type-II (Fo-92)] 所示。大孢子 (macroconidia) 為鐮刀形，無色，大多 3 個隔膜，著生於分生孢子梗 (conidiophores) 之瓶狀枝上，Fo-51 與 Fo-92 之大孢子大小分別為 37.3–44.3 × 2.9–4.2 μm 與 30.7–44.9 × 2.6–3.8 μm。小孢子 (microconidia) 為橢圓形或臘腸型，無色，著生於分生孢子梗之瓶狀枝上，呈假頭狀 (false heads) 排列，Fo-51 與 Fo-92 之小孢子大小分別為 4.7–9.6 × 1.7–3.0 μm 與 3.9–11.0 × 2.1–3.6 μm。厚膜孢子 (chlamydospores) 形狀近圓形或球形、無色，形成於菌絲上，Fo-51 與 Fo-92 之厚膜孢子直徑分別為約 6.3–9.3 μm 與 5.2–6.9 μm。

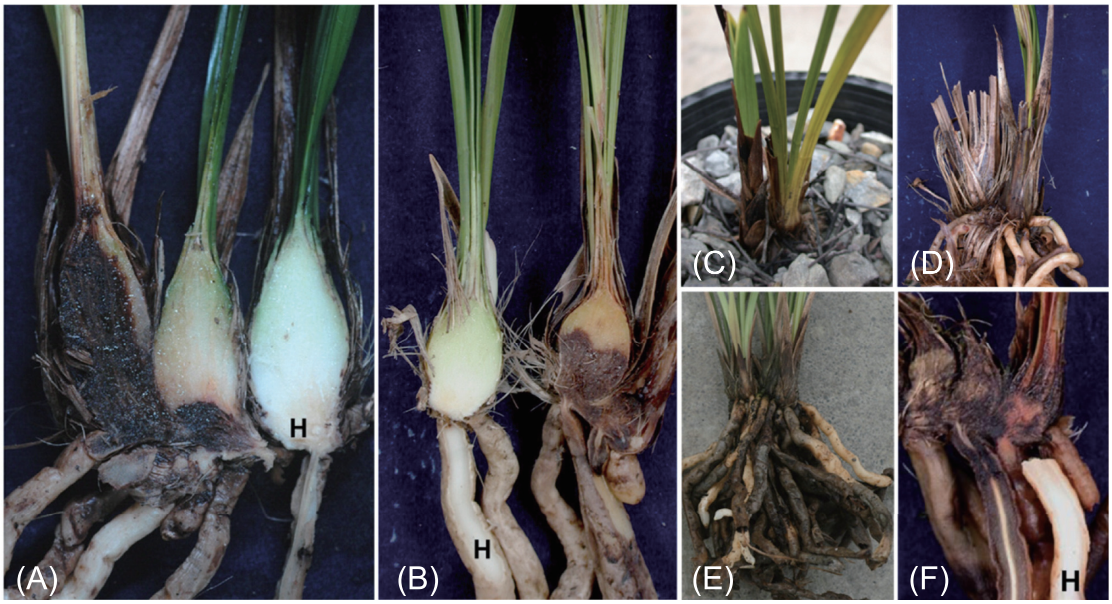


圖 1. 小花蕙蘭假球莖腐敗病之病徵 (A：報歲蘭；B–F：四季蘭)。(A–B) 罹病植株之假球莖縱剖後組織黑褐化腐敗、(C) 葉片呈現黃化褐化、(D) 落葉現象、(E) 根部黑褐化現象、(F) 罹病根縱剖後組織黑褐化腐敗。H：健康植株。

Fig. 1. Symptoms of pseudobulb rot of *Cymbidium* spp. (A: *Cymbidium sinense*; B–E: *Cymbidium ensifolium*). Infected plant exhibiting cross section of pseudobulb revealing black-brown rot on (A) *C. sinense* and (B) *C. ensifolium*, (C) leaf yellowing, browning and (D) defoliation, (E) black browning and rot of the roots. (F) Cross section revealing root rot symptom. H: healthy plants.

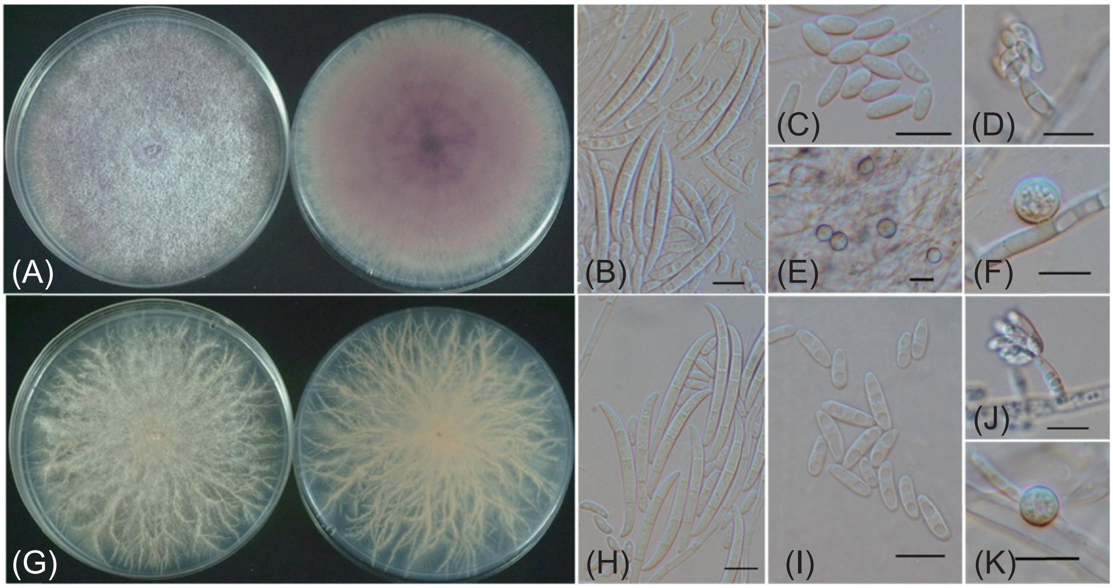


圖 2. 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌 [A–F: type-I (Fo-51); G–K: type-II (Fo-92)] 之菌落與孢子形態特徵。小花蕙蘭假球莖腐敗病菌於 PDA 培養基上於 24℃ 培養 7 d 後的菌落形態 (A) Fo-51、(G) Fo-92。(B、H) 大孢子。(C、I) 小孢子。(D、J) 小孢子呈假頭狀排列。(E、F、K) 厚膜孢子。標尺 = 10 μm。

Fig. 2. Colony and conidia morphological characteristics of *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51, A to F) and type-II (Fo-92, G to K) isolates. Colony of *F. oxysporum* (A) Fo-51 and (G) Fo-92 grown on potato dextrose agar (PDA) at 25℃ for 7 d, (B, H) macroconidia, (C, I) microconidia, (D, J) microconidia produced in false heads and (E, F, K) chlamydospores. Bar = 10 μm.

為進一步鑑定菌株，將 Fo-51 與 F-92 分離株之 ITS 序列 (accession No. 分別為 MK942633 與 MK942634) 和 TEF-1α 序列 (accession No. 分別為 MN162686 與 MN162687) 與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫進行分析比對。結果顯示，供試菌株與 LL-5、DHTG-7 strain 之 ITS 序列 (MK966308與MK692865) 與 MRC 1694 strain、STAT9 strain 之 TEF-1α 序列 (MH582350 與 KX822794) 之序列相似度高達 99.4% 以上。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果，證明由假球莖腐敗病罹病組織所分離之病原菌為 *F. oxysporum* (Kim *et al*. 2002a; Srivastava *et al*. 2018; Yao *et al*. 2018)。

小花蕙蘭假球莖腐敗病之病原性測定

為了進一步測定其病原性，本研究將Fo-51 與 Fo-92 分離株之孢子懸浮液分別接種於報歲蘭與四季蘭之葉片、假球莖及根部上。在葉片上，於接種 14 d 後，Fo-51 分離株造成報歲蘭與四季蘭葉片上產生黑褐色近圓形或不規則病斑，而 Fo-92 分離株在報歲蘭葉片上則會造成黃褐色塊斑，但在四季蘭葉片上其病斑不明顯；在假球莖上，Fo-51 與 Fo-92 皆於接種 4 wk 後，報歲蘭與四季蘭植株即出現葉片失水之病徵，於 8 wk 後可見植株黃化、萎凋現象。接種部位褐化，將罹病假球莖縱剖，可見內部組織疏鬆、黑褐化。另外，在根部上，兩菌株於接種 6 wk 後，在報歲蘭與四季蘭之根系內部組織造成黑褐化腐敗現象 (圖 3、圖 4)。之後再從這些罹病組織進行分離，結果顯示所得菌株與原接種病原菌菌株，其形態特徵皆相同，完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)，證實 *F. oxysporum* Fo-51 與 Fo-92 兩分離株皆對報歲蘭與四季蘭具有病原性。

小花蕙蘭假球莖腐敗病菌對不同品種蘭花之病原性

為進一步瞭解 *F. oxysporum* 對不同蘭花品種之病原性，本研究將 4 株分離株之孢子懸

圖 3. 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* 對報歲蘭之病原性試驗。健康植株接種 (A–E) *F. oxysporum* Fo-51 與 (F–J) Fo-92 之假球莖、根系及葉片後病徵表現，以 (K–O) 接種無菌水為對照組。

Fig. 3. Pathogenicity tests of *Fusarium oxysporum* on *Cymbidium sinense*. Severe symptoms on pseudobulb, root and leaf of *C. sinense* plant inoculated with conidial suspension of (A–E) *F. oxysporum* Fo-51 and (F–J) Fo-92 after inoculation. (K–O) Treatments inoculated with water as control.

浮液分別接種於報歲蘭、四季蘭、虎頭蘭、文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭、石斛蘭等 7 種不同蘭花品種之假球莖上。於接種 4 wk 後，Fo-50、Fo-51、Fo-72 及 Fo-92 均可造成報歲蘭、四季蘭及虎頭蘭之地上部葉片開始出現失水、黃化現象，而後植株逐漸衰弱。於接種 8 wk 後，植株萎凋，縱剖假球莖可見內部組織褐化腐敗。而所有測試菌株接種於文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭、石斛蘭等假球莖亦未見病徵產生 (表 1)。

溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將小花蕙蘭假球莖腐敗病菌菌絲塊培養於不同溫度之培養箱中，其生長結果如圖 5 所示。Fo-51 與 Fo-92 於 12–28℃培養時，其菌絲生長隨著溫度升高而增快，於 28℃培養時，對菌絲生長最為有利。於培養後 7 d 時，其平均生長直徑分別為 8.1 cm 與 8.5 cm；於 28–36℃下生長速率遞減，至 40℃時完全不生長。另外，溫度對本菌孢子發芽之影響結果則如圖 6 所示，在 24℃與 28℃下，於無菌水中 24 h，

圖 4. 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* 對四季蘭之病原性試驗。健康植株接種 (A–E) *F. oxysporum* Fo-51 與 (F–J) Fo-92 之假球莖、根系及葉片後病徵表現，以 (K–O) 接種無菌水為對照組。

Fig. 4. Pathogenicity tests of *Fusarium oxysporum* on *Cymbidium ensifolium*. Severe symptoms on pseudobulb, root and leaf of *C. ensifolium* plant inoculated with conidial suspension of (A–E) *F. oxysporum* Fo-51 and (F–J) Fo-92 after inoculation. (K–O) Treatments inoculated with water as control.

表 1. 假球莖腐敗病菌對不同蘭花寄主之病原性測定。

Table 1. Host specificity test of *Fusarium oxysporum* at 12 wk postinoculation based on pseudobulb assay.

	Pathogenicity[z]			
Tested orchid variety	Fo-50 (type-I)	Fo-51 (type-I)	Fo-72 (type-I)	Fo-92 (type-II)
Cymbidium sinense	+	+	+	+
Cymbidium ensifolium	+	+	+	+
Cymbidium hookerianum	+	+	+	+
Oncidium flexuosum	—	—	—	—
Paphiopedilum insigne	—	—	—	—
Cattleya	—	—	—	—
Dendrobium moniliforme	—	—	—	—

[z] Symptom of pseudobulb rot was recorded at 12 wk after inoculation.

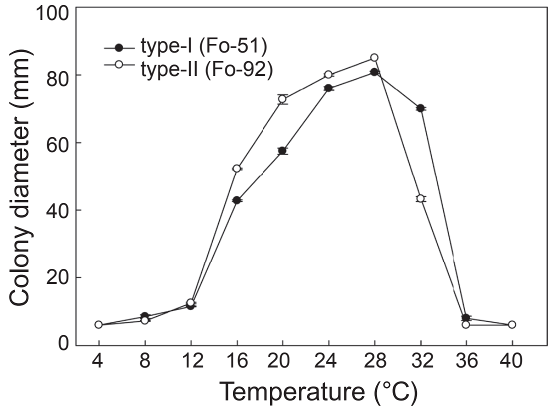


圖 5.　不同溫度對假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) 與 type-II (Fo-92) 分離株病原菌菌絲生長之影響 (在 PDA 平板培養 7 d)。

Fig. 5.　Effect of temperature on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) and type-II (Fo-92) isolate cultured on potato dextrose agar plates for 7 d.

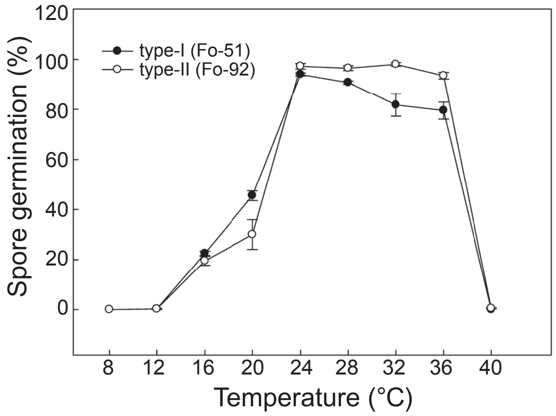


圖 6.　不同溫度對假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) 與 type-II (Fo-92) 分離株孢子發芽之影響。

Fig. 6.　Effect of temperature on spore germination of *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) and type-II (Fo-92) isolates.

Fo-51 與 Fo-92 分離株之孢子發芽率皆達 90% 以上；且在 32℃與 36℃下，Fo-51 分離株之發芽率為 80% 以上，Fo-92 分離株仍有 90% 以上發芽率。16℃以下不利孢子發芽，Fo-51 分離株之發芽率為 22.5%，而 Fo-92 分離株則為 19.5%；而 8℃及 40℃下，孢子則完全不發芽。

溫度對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

以 Fo-51 分離株之分生孢子懸浮液分別接種於四季蘭與報歲蘭，放置於不同溫度之定溫箱中，結果如圖 7 所示。25℃及 30℃為發病適溫，接種 30 d 後兩品種小花蕙蘭植株開始出現失水現象；於接種 45 d 後，兩品種小花蕙蘭之罹病度為 75.0% 以上；於接種 60 d 後，兩品種小花蕙蘭之罹病度高達 87.5–100.0%。於 20℃下，四季蘭需 45 d 才出現葉片黃化、失水病徵，於接種 60 d 後，四季蘭之罹病度則為 81.6%。但報歲蘭於接種 90 d 後，植株仍僅呈現失水且部分植株輕微黃化的現象，其罹病度僅為 50.3%。於 15℃下，四季蘭與報歲蘭分別需 60 d 和 75 d 時植株開始出現失水、黃化的病徵，其罹病度分別為 12.5% 與 18.9%。

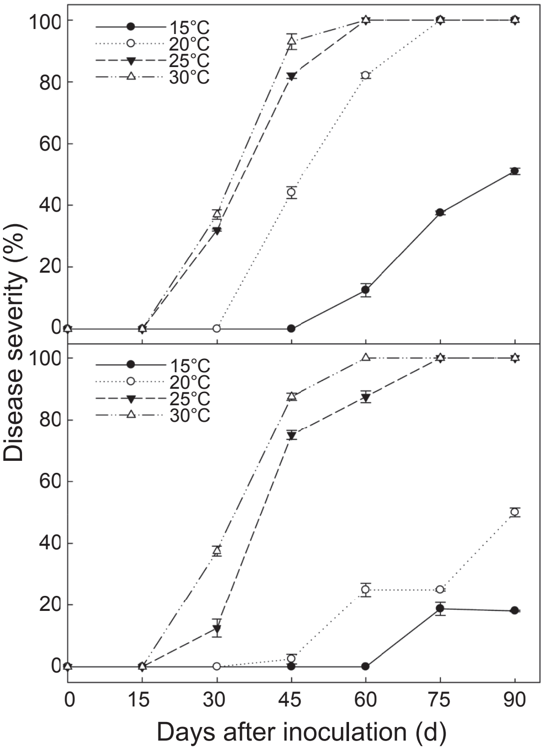


圖 7.　不同溫度對小花蕙蘭球莖腐敗病勢進展之影響。(A) 四季蘭；(B) 報歲蘭。

Fig. 7.　Effect of temperature on disease severity of pseudobulb rot disease of *Cymbidium* [(A) *Cymbidium ensifolium*; (B) *Cymbidium sinense*] inoculated with *Fusarium oxysporum* Fo-51 isolate.

討論

小花蕙蘭為台灣主要外銷蘭花之一，而本研究於 2003–2005 年調查新竹縣、台中市東勢區、后里區、潭子區、霧峰區、大甲區、南投縣魚池鄉等 12 處小花蕙蘭栽培園，發現小花蕙蘭假球莖腐敗病在栽培區普遍發生。嚴重時發病率可達 50%，其罹病植株呈現葉片黃化、失水萎凋狀。當葉片整片褐化後，易抽起與假球莖分離，只存留假球莖與殘留之葉基部，嚴重時造成植株萎凋死亡。縱剖開罹病植株，可見假球莖及連接根部組織呈黑褐化腐敗現象，腐敗病徵亦蔓延至幼芽，常造成分芽移植後植株不久即出現相同病害，影響移植存活率甚鉅，造成農友莫大之損失。

本試驗由小花蕙蘭假球莖腐敗病罹病組織上進行組織分離、純化後，再經形態特徵、核酸序列比對及病原性測定，確定引起小花蕙蘭假球莖腐敗病之病原為 *F. oxysporum*。經由本研究在田間觀察與取樣檢驗的結果，除了 *F. oxysporum* 之外，*Fusarium proliferatum*、*Phytophthora* sp. 及軟腐細菌 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 有時也會引起小花蕙蘭葉片黃化、失水萎凋狀而易抽起與假球莖分離的病徵，但只有 *F. oxysporum* 會造成假球莖與根部褐化腐敗的病徵，故將此病害取名為假球莖腐敗病。國外的研究報告對於 *F. oxysporum* 造成小花蕙蘭假球莖與根部褐化腐敗的病害名稱尚有莖腐 (stem rot)、乾腐 (dry rot)、球莖及根腐 (bulb and root rot) (Benyon *et al*. 1996; Kim *et al*. 2002a; Jee *et al*. 2003; Yao *et al*. 2018)，由於病徵主要出現在假球莖且不限於乾腐，故本文仍以假球莖腐敗病為病名。

由文獻得知，鐮孢病菌屬中除了 *F. oxysporum* 外，其他病原菌如 *F. proliferatum*、*Fusarium solani*、*Fusarium subglutinans*、*Fusarium fractiflexum*、*Fusarium circinatum* 會造成多種蘭花葉部、假球莖及根部病害，且常常在同一罹病組織上不只一種病原菌存在，其造成病徵也類似 (Latiffah *et al*. 2009; Srivastava *et al*. 2018)。除了 *F. oxysporum* 之外，造成小花蕙蘭根部腐爛之鐮孢菌還有 *F. proliferatum*、*F. solani*、*F. subglutinans* (Benyon *et al*. 1996; Kim *et al*. 2002a; Kim *et al*. 2002b)，所以在診斷小花蕙蘭的根部病原菌應注意鐮孢菌種的鑑定，以免誤判。*F. oxysporum* 為鐮孢菌屬 (*Fusarium* species) 中於蘭園廣泛存在又兼具破壞性的植物病原菌之一，此病原菌已被報導普遍存在於美國、澳洲、台灣、韓國、印度、馬來西亞、日本、中國大陸等國家的蘭園中 (Burnett 1985; Kim *et al*. 2002b; Latiffah *et al*. 2009; Vijayan *et al*. 2012; Huang *et al*. 2014; Swett & Uchida 2015; Srivastava *et al*. 2018; Yao *et al*. 2018)。其中，嘉德麗雅蘭 (*Cattleya*)、小花蕙蘭 (*Cymbidium*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、堇花蘭 (*Miltonia*)、文心蘭 (*Oncidium*) 及蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 等均受到 *F. oxysporum* 危害的紀錄 (Burnett 1985; Kim *et al*. 2002b; Pedroso-de-Moraes *et al*. 2011; Swett & Uchida 2015; Srivastava *et al*. 2018; Yao *et al*. 2018)。

F. oxysporum 是一種複合種 (complex species)，具有腐生性 (saprophytic) 與病原性 (phytopathogenic)，具病原性之菌株其感染的作物範圍廣泛，至少有 150 種寄主植物，常造成許多經濟作物的嚴重損失 (Lecomte *et al*. 2016; Srivastava *et al*. 2018)。其可以厚膜孢子形態殘存於土壤或植物殘體中達數年之久 (Notz *et al*. 2002)，當植株根部被 *F. oxysporum* 病原感染後造成根腐、植株萎凋狀，有時造成莖腐現象，一旦病原菌侵入感染植物維管束系統，植物吸收養分、水分受阻而導致植株死亡 (Burnett 1985; Latiffah *et al*. 2009; Srivastava *et al*. 2018)。本研究從小花蕙蘭假球莖腐敗病之罹病植株分離獲得的菌株，依培養菌落形態可區分為兩型，type-I 與 type-II 菌株均可在報歲蘭與四季蘭之葉片、假球莖及根部上造成病徵，顯示兩型菌株皆對報歲蘭與四季蘭具有病原性。但 type-II 菌株分離率很低，僅在南投縣魚池鄉某一蘭園分離得到。

另外，為了進一步瞭解不同寄主間其病原性差異，本試驗將分離得到的菌株再進行寄主範圍之病原性測定。由試驗結果發現，type-I 型

之 Fo-50、Fo-51 及 Fo-72 分離株與 type-II 型之 Fo-92 分離株，不僅可危害報歲蘭與四季蘭外，亦造成大花蕙蘭-虎頭蘭之假球莖腐敗病病徵；但 type-I 與 type-II 型之分離株皆未在文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭及石斛蘭植株產生病徵。由試驗結果得知，type-I 與 type-II 型之分離菌株具有相似的寄主範圍。根據文獻得知，*F. oxysporum* 菌株常依據其寄主專一性，可再細分為分化型 (*forma specialis*)，目前有超過至少 70 種*formae speciales* (Armstrong & Armstrong 1981)，例如 *F. oxysporum* f. sp. *cattleyae*、*F. oxysporum* f. sp. *vanilla*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 等 (Pinaria *et al*. 2010; Pedroso-de-Moraes *et al*. 2011; Srivastava *et al*. 2018)。因此，小花蕙蘭的病原性鐮孢菌是否可區分為不同的分化型，未來仍需收集更多菌株進行驗證，進而探討是否有分化型存在。

本研究另測試溫度對 *F. oxysporum* 分離株菌絲生長與孢子發芽之影響，結果發現 16–32℃為本菌菌絲可生長之溫度。其中，又以 28℃培養之菌絲生長較為快速，而 8℃以下與 36℃以上之溫度，菌絲幾乎停止生長；本研究亦發現在 24–36℃溫度下，測試的兩分離株之孢子發芽率均可達約 80% 以上，顯示台灣的溫暖氣候下有利於本病原菌侵入感染。另外，在溫度對病害發生之影響結果發現在 25–30℃下，於接種 30 d 後，報歲蘭與四季蘭之罹病度約 25–30%。當接種後至 45 d，兩品種小花蕙蘭之罹病度提升至 75% 以上，當接種後至 60 d，則高達 100% 罹病度；而接種 45 d 後，20℃下僅有四季蘭植株之罹病度為 44%，報歲蘭植株則未發病；15℃下兩品種小花蕙蘭亦未發病。此結果與 Elmer & Daughtrey (2012) 指出康乃馨萎凋病在 18℃下，根部雖有病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* 存在，但在康乃馨植株上則未有病徵表現結果具相似性。顯示低溫的環境下，不僅可抑制病害發生，亦可減緩病徵進展 (Gullino *et al*. 2015)。

本研究結果釐清台灣小花蕙蘭假球莖腐敗病係由 *F. oxysporum* 病原菌所引起，台灣的氣候條件適合本病原菌之侵入感染，更有利於病害之進展。另外，低溫環境下可抑制病害發生，可利用遮陽黑布方式來降低溫室內溫度，進而減緩病害發生。但未來仍須釐清田間病害之感染源，並持續進行如物理防治、化學防治或生物防治等防治策略的評估，以供防治本病害之參考。

引用文獻

Armstrong, G. M. and J. K. Armstrong. 1981. *Formae speciales* and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases. p.391–399. *in*: *Fusarium*: Disease, Biology, and Taxonomy. (Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and R. J. Cook, eds.) Pennsylvania State University Press. University Park, PA. 457 pp.

Benyon, F., B. A. Summerell, and L. W. Burgess. 1996. Association of *Fusarium* species with root rot of *Cymbidium* orchids. Australas. Plant Pathol. 25:226–228.

Burnett, H. C. 1985. Orchids. p.283–351. *in*: Disease of Floral Crops. Vol. II. (Strider, D. L., ed.) Prager Pub. New York, NY.

Du Puy, D. and P. Cribb. 2007. Genus Cymbidium (Botanical Magazine Monograph). Royal Botanic Gardens, Kew. Richmond, UK. 369 pp.

Elmer, W. H. and M. Daughtrey. 2012. Fusarium wilt of cyclamen. p.213–219. *in*: Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops. (Gullino, M. L., J. Katan, and A. Garibaldi, eds.) APS. St. Paul, MN. 256 pp.

Geiser, D. M., M. del Mar Jiménez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau, and K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur. J. Plant Pathol. 110:473–479.

Gullino, M. L., M. L. Daughtrey, A. Garibaldi, and W. H. Elmer. 2015. Fusarium wilts of ornamental crops and their management. Crop Prot. 73:50–59.

Hsu, J. H. 2010. The role of pseudobulb in the birth of orchids. p.154–162. *in*: Taichung District Agricultural Research and Extension Station. Special issue, No. 105. (Tsai, Y. F., ed.) Taichung District Agricultural Research and Extension Station. COA. Taichung, Taiwan. 248 pp. (in Chinese with English abstract)

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

Huang, L.W., C. J. Wang, Y. S. Lin, W. C. Chung, and W. H. Chung. 2014. Stem rot of jewel orchids caused by a new forma specialis, *Fusarium oxysporum* f.

sp. *anoectochili* in Taiwan. Plant Pathol. 63:539–547.

Hung, H. C., F. M. Wei, and C. S. Chang. 2010. *Cymbidium* Production Operations Manual. Taichung District Agricultural Research and Extension Station. COA. Taichung, Taiwan. 135 pp. (in Chinese)

Hung, H. C., M. H. Wang, and F. H. Chang. 2017. Effects of tissue culture plantlet size on the seedling growth performance of *Cymbidium*. Bulletin of TDARES 135:39–45. (in Chinese with English abstract)

Jee, H. J., S. M. Lee, and W. D. Cho. 2003. Effects of prochloraz and tebuconazole on control of fusarium bulb and root rot of oriental orchid, *Cymbidium goeringii*. Res. Plant Dis. 9:72–78.

Kim, W. G., B. D. Lee, W. D. Cho, and J. M. Sung. 2002a. Occurrence of dry rot on *Cymbidium* orchids caused by *Fusarium* spp. in Korea. Plant Pathol. J. 18:156–160.

Kim, W. G., B. D. Lee, W. S. Kim, and W. D. Cho. 2002b. Root rot of moth orchid caused by *Fusarium* spp. Plant Pathol. J. 18:225–227.

Latiffah, Z., M. Z. Nur Hayati, S. Baharuddin, and Z. Maziah. 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium*. Asian J. Plant Pathol. 3:14–21.

Lecomte, C., C. Alabouvette, V. Edel-Hermann, F. Robert, and C. Steinberg. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. Biol. Control 101:17–30.

Leslie, J. F., B. A. Summerell, and S. Bullock. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Wiley-Blackwell. Hoboken, NJ. 388 pp.

Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach, D. Haas, and G. Défago. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 68:2229–2235.

O'Donnell, K., H. C. Kistler, E. Cigelnik, and R. C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:2044–2049.

Pedroso-de-Moraes, C., M. C. de Souza, C. C. Ronconi, and M. A. Marteline. 2011. Response of *cattleya* hybrids for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae* Foster. Braz. Arch. Biol. Technol. 54:267–271.

Pinaria, A. G., E. C. Y. Liew, and L. W. Burgess. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. Australas. Plant Pathol. 39:176–183.

Srivastava, S., C. Kadooka, and J. Y. Uchida. 2018. *Fusarium* species as pathogen on orchids. Microbiol. Res. 207:188–195.

Summerell, B. A., J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press. St. Paul, MN. 392 pp.

Swett, C. S. and J. Y. Uchida. 2015. Characterization of *Fusarium* diseases on commercially grown orchids in Hawaii. Plant Pathol. 64:648–654.

Tsai, C. Y. 1998. Chinese cymbidium cultivation management. Kaohsiung Dist. Agri. News 27(3):8–10. (in Chinese with English abstract)

Vijayan, A. K., L. Sithara, K. P. Sreelakshmi, J. Thomas, J. Thomas, R. S. Misra, and K. A. Saju. 2012. Molecular diversity of *Fusarium oxysporum* causing rot diseases of vanilla in south India. Arch. Phytopathology Plant Protect. 45:1319–1326.

White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. New York, NY. 482 pp.

Yao, J. A., P. Huang, C. Z. Lan, and D. Y. Yu. 2018. Stem rot on *Cymbidium ensifolium* (Orchidaceae) caused by *Fusarium oxysporum* in China. Can. J. Plant Pathol. 40:105–108.

Pseudobulb Rot of *Cymbidium* Caused by *Fusarium oxysporum*

Chiao-Wen Huang[1], Jin-Hsing Huang[2,*], Yi-Ching Li[3], Chun-Wei Chen[4], and Ting-Fang Hsieh[5]

Abstract

Huang, C. W., J. H. Huang, Y. C. Li, C. W. Chen, and T. F. Hsieh. 2020. Pseudobulb rot of *Cymbidium* caused by *Fusarium oxysporum*. J. Taiwan Agric. Res. 69(1):65–76.

A kind of disease causing pseudobulb rot disease was commonly observed in *Cymbidium* cultivation area in Taiwan. The disease symptoms included yellowing or withering of leaves and finally plant death. All the infected plants showed brown rot of pseudobulb and root. Two strains of *Fusarium* sp. showing different colony types were consistently isolated from the infected pseudobulbs and roots. On potato dextrose agar at 25–30℃ cultured under 12 h photoperiod for more than 2 weeks, type-I isolates presented light purple colony and type-II isolates presented terra yellow colony. In disease investigation, the isolation frequency of type-I *Fusarium* was much higher than type-II *Fusarium*. Both of these two types of *Fusarium* sp. were identified as *Fusarium oxysporum* based on morphological characteristics as well as sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) and translation elongation factor 1 alpha (TEF-1α) genes. Pathogenicity test of these two pathogens on *Cymbidium sinense* and *Cymbidium ensifolium* (by inoculation of spore suspension on root, pseudobulb and leaf) was confirmed for fulfilling the Koch's postulates. The temperature range for mycelial growth of these two types of pathogen was the same at 16–32℃ (optimal at 24–28℃), and for spore germination was the same at 16–36℃ (optimal at 24–36℃). The temperature range for disease development of type-1 *F. oxysporum* was 15–30℃(optimal at 25–30℃). The host range test showed that these two types of pathogen could infect *C. sinense*, *C. ensifolium* and *Cymbidium hookerianum*, but not other tested orchids, such as *Oncidium flexuosum*, *Paphiopedilum insigne*, *Cattleya* and *Dendrobium moniliforme*.

Key words: *Cymbidium*, Pseudobulb, Root rot, *Fusarium oxysporum*.

Received: August 19, 2019; Accepted: October 25, 2019.
* Corresponding author, e-mail: jhhuang@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Contract Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
5 Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):77–89 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0006

研究報告

感染沙漠玫瑰的緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 之鑑定與檢測

林羿廷 [1]　蔡錦慧 [1]　林玟珠 [2]　鄧汀欽 [3,*]

摘要

林羿廷、蔡錦慧、林玟珠、鄧汀欽。2020。感染沙漠玫瑰的緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 之鑑定與檢測。台灣農業研究 69(1):77–89。

2013 年高雄「大紅花」沙漠玫瑰，疑似病毒感染，經單斑接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)，分離得到一個病毒純系的分離株 DR-TW。經免疫分析顯示此分離株與雞蛋花嵌紋病毒 (*Frangipani mosaic virus*; FrMV) 及番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) 等菸草嵌紋病毒屬 (*Tobamovirus*) 的病毒抗體有交互反應。汁液接種番杏、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste *et* Reyn)、奎藜、綠藜 (*Chenopodium murale* L.)、千日紅 (*Gomphrena globosa* L.) 及曼陀羅後都呈局部病斑，菸草、雞蛋花及沙漠玫瑰植株則形成系統性嵌紋，但對辣椒、番茄等茄科植物的病原性及致病力均弱於 ToMV。以菸草嵌紋病毒屬廣效性引子對 TobRT up1/TobRT do2 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，增幅出 568 bp 的核酸片段。經定序後與 GenBank 中的核苷酸序列進行比對，結果顯示沙漠玫瑰台灣分離株 (DR-TW) 與緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*; PluMV) 的相同度高達 98%。進行 DR-TW 基因體定序，得核苷酸全長 6,683 bp (GenBank accession number KX881422)，共轉錄出 188.3 kDa 及 130.4 kDa 的複製酶、28.7 kDa 的移動蛋白及 19.0 kDa 的鞘蛋白。設計 PluMV 專一性引子對 (PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw)，經 RT-PCR 可增幅出 PluMV 的核酸片段 643 bp，其他 8 個供試菸草嵌紋病毒屬病毒則無。配合 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up/FrMVcp-dw，以 RT-PCR 即可鑑別 FrMV 及 PluMV。

關鍵詞：台灣、分離株、菸草嵌紋病毒屬、雞蛋花嵌紋病毒。

前言

沙漠玫瑰 (desert rose) 學名 *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult. 屬於龍膽目 (Gentianales) 夾竹桃科 (Apocynaceae) 天寶花屬 (*Adenium*) 多年生肉質灌木，原產於非洲沙漠地區，具強韌的生命力，花色如紅玫瑰，故得名。沙漠玫瑰在盛夏開花，其花形與花色艷麗，1968 年引進台灣後，園藝育成的多樣化品種加上盆栽藝術，沙漠玫瑰已成為觀賞植物之一，目前育種栽培及種苗外銷在台灣中南部都有商業模式的經營生產。

沙漠玫瑰繁殖方式主要採用種子生產實生苗，但利用壓條或扦插亦可無性繁殖。由於栽培過程中頻繁的嫁接或盆栽雕塑，使沙漠玫瑰感染病毒的現象日漸普遍。台灣已有胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 感染沙漠玫瑰的紀錄 (Chen *et al*. 2012)，本研究從沙漠玫瑰另外分離出一種新的病毒，初步鑑定屬於菸草嵌紋病毒屬 (*Tobamovirus*) (Deng *et al*.

投稿日期：2019 年 8 月 20 日；接受日期：2019 年 10 月 25 日。
* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

2015)，進一步經抗體反應、全核酸解序及親緣分析，鑑定為緬梔嵌紋病毒。本研究部分原始資料已在 2017 年度植物病理學會年會論文宣讀中發表 (Lin *et al*. 2018)。

材料與方法

病毒來源及分離

2013 年 10 月自高雄橋頭採得「大紅花」沙漠玫瑰樣本，其葉片皺縮，呈黃綠嵌紋疑似病毒感染的病徵 (圖 1A)。以 10× 量 (W/V) 之 0.1 M，pH 7.1 磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 研磨葉片，取粗汁液以磨擦方式接種於撒布金鋼砂的供試植株葉片，包括紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste *et* Reyn)、綠藜 (*Chenopodium murale* L.)、奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)、千日紅 (*Gomphrena globosa* L.) 及圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana* L.) 等指示植物。在奎藜接種葉形成局部病斑 (圖 1B)，經 3 次單斑接種，分離得到一個病毒純系，稱為沙漠玫瑰台灣分離株 (DR-TW)。定期接種奎藜，更新保存於防蟲網室，為以下鑑定試驗的病毒來源。

寄主範圍試驗

以 DR-TW 作為供試病毒，以上述接種方法，接種 8 科 25 種 (表 1) 植物的實生苗，包括回接沙漠玫瑰等。每日觀察並記錄接種葉及新葉的病徵，於網室中觀察至少 1 mo，最後以酶聯抗體免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 或 RT-PCR 確認感染情形。

ELISA

供試檢測抗原及抗體為實驗室先前所製備保存，病毒種包括 *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) (Deng *et al*. 2011)、菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV) (Liao *et al*. 2007)、ToMV (Deng *et al*. 2012) 及山葵斑駁病毒 (*Wasabi mottle virus*; WMoV) (Deng *et al*. 2016)。市售免疫檢測試劑組針對 *Tobamovirus* 所屬病毒種 FrMV、*Maracuja mosaic virus* (MarMV)、*Pepper mild mottle virus* (PMMoV)、*Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) 均購自 AC Diagnostics Inc. (Fayetteville, AR, USA)。免疫球蛋白 (immunoglobulin G; IgG) 純化及 ELISA 沿襲 Clark & Adams (1977) 的方法。ELISA-供試檢體 (葉片) 以等量 coating buffer 混合取液，經間接法 ELISA (Koenig 1981)，最後測定微量盤中各穴的樣品在 405 nm 之吸收值 (A405nm)。

西方墨漬法 (Western blot)

供試檢測抗原為前述病毒，抗體為 ToMV 及 tobamovirus 廣效性多元抗血清 (Chou *et al*. 2018)。依據 Towbin *et al*. (1979) 的方法，將供試檢體以含有 1% SDS 的 12% polyacrylamide 進行膠體電泳 (SDS-PAGE) 後，將蛋白轉漬於 0.45 μm 硝化纖維紙 (nitrocellulose paper)，再與上述各種抗體反應，然後加入以鹼性磷酸酶標定之山羊抗兔免疫球蛋白 (Sigma A3687)。反應後，以基質 nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) 及 5-bromo-4-chloro-3’-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP) 呈色。

RT-PCR

取 100 mg 病株葉肉組織利用全量 RNA 純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Miniprep System; Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 萃取 RNA。以病毒 total RNA 為模板，應用 *Tobamovirus* 屬廣效性引子對 TMVmpf (5’-AGTTGTTGATGAGTTCATGGA-3’) 及 TMV3nr (5’-CAACCCTTCGATTTAAGTGGA-3’) (Huang *et al*. 2004) 與 TobRT up1 (5’-GARTAYSCIGCIYTICARAC-3’) 及 TobRT do2 (5’-BGCYTCRAARTTCCA-3’) (Dovas *et al*. 2004) 進行 RT-PCR，取 2 μL RNA、1 μL Forward primer (10 μM)、1 μL Reverse primer (10 μM) 及 16 μL DEPC-water，加入 AccuPower RT-PCR Premix tube (Bioneer, Daejeon, Korea) 中混合均勻，將反應液置於 Biometra FlexCycler2 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) 中進行增幅。RT 反應條件如下，先於 95℃反應 5 min，4℃反應 15 min，42℃反應 60 min，95℃反應 15 min，之後再進行 35 個循環 PCR 反應 95℃ 30 s，55℃或 44℃ 30 s，70℃ 60 s，最後再進行 70℃ 10 min。RT-PCR 產物以 1.2% agarose 進行電泳分析，預期片段分別為約 800 bp 或 568 bp 之核苷酸片段。

病毒核酸定序與親緣分析

將上述 DR-TW 所增幅之核酸片段，應用 yT&A 載體及 ECOS101 勝任細胞 (Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan) 進行選殖後，委由明欣生物科技公司 (台灣台北市) 進行核苷酸定序分析。所得之 DR-TW 的序列與 GenBank 上登

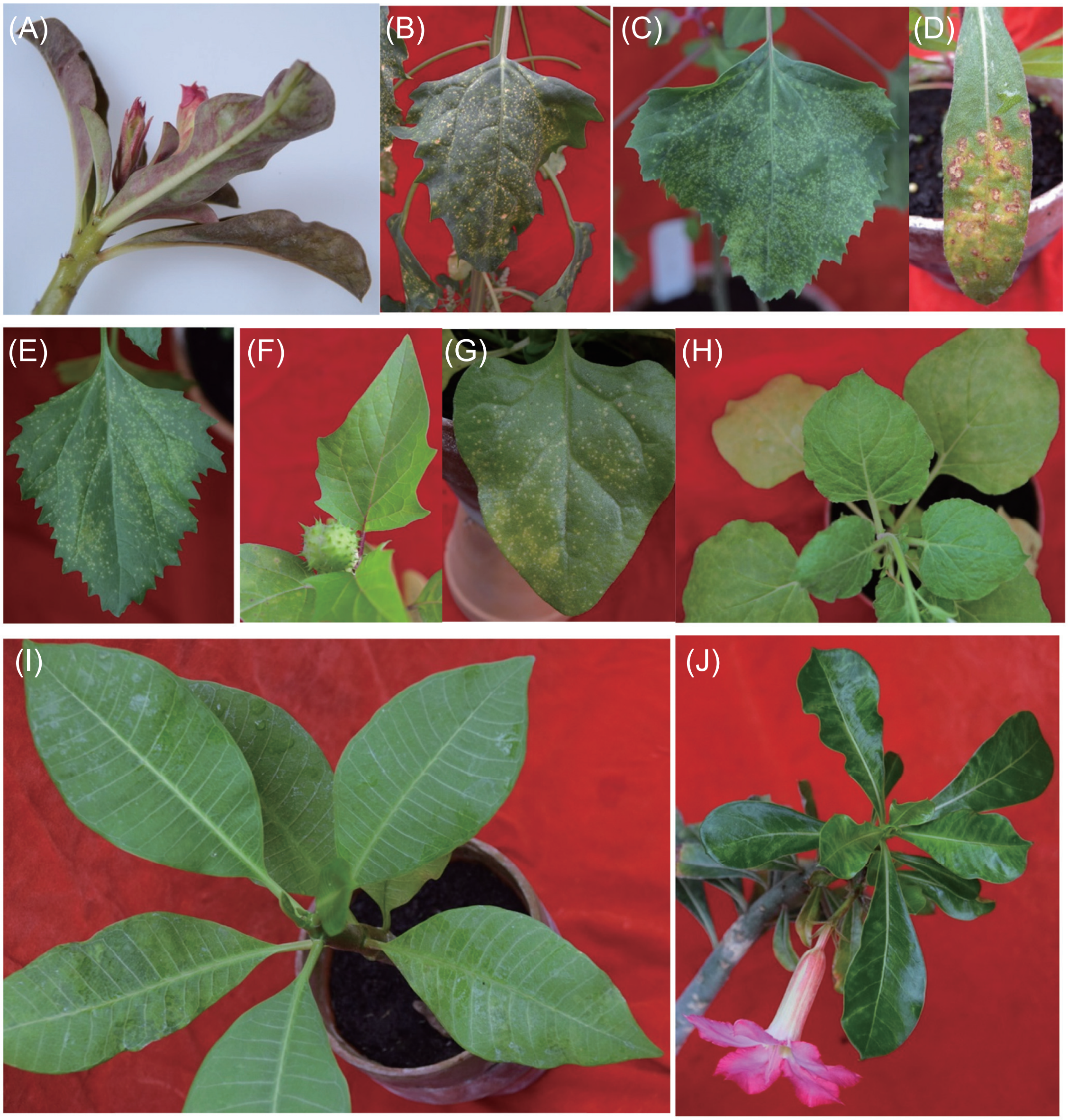


圖 1. (A)「大紅花」沙漠玫瑰疑似病毒感染的病徵。接種沙漠玫瑰病毒分離株 (DR-TW)，葉片出現局部病斑：(B) 奎藜、(C) 紅藜、(D) 千日紅、(E) 綠藜、(F) 曼陀羅及 (G) 番杏；局部病斑以外也出現系統性嵌紋病徵：(H) 圓葉菸草、(I) 雞蛋花及 (J) 沙漠玫瑰。

Fig.1. (A) Desert rose 'Da-hong-hua' with virus-like symptoms. By inoculation of virus isolate 'DR-TW', local lesions developed on leaves of (B) *Chenopodium quinoa*, (C) *Chenopodium amaranticolor*, (D) *Gomphrena globosa*, (E) *Chenopodium murale*, (F) *Datura stramonium* and (G) *Tetragonia tetragonioides*, and systematic mosaic showed on plants of (H) *Nicotiana benthamiana*, (I) *Plumeria rubra* and (J) *Adenium obesum*.

錄之核苷酸序列進行比對，並利用 MegAlign Pro (Lasergene 13; DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 中的 Clustal Omega 對鞘蛋白之核苷酸序列及胺基酸序列進行 alignment 後，再以 MEGA 7.0 (http://www.megasoftware.net) 之 Neighborhood-joining 將全基因的核苷酸序列繪製親緣關係樹狀圖 (Bootstrap 分析 1,000 次)。

全長度基因體核苷酸序列定序分析

先以 Random hexamer/oligodT21 引子對進行 cDNA 的合成，依據 CP 基因的核苷酸序列

表 1. 沙漠玫瑰分離株 (DR-TW) 接種試驗的寄主範圍與病徵表現。

Table 1. Experimental host range and symptoms induced by inoculation of virus isolate ‘DR-TW’.

Family	Species	Symptom[z]
Acanthaceae	*Dicliptera chinensis* (L.) Juss.	–/–
Aizoaceae	*Tetragonia tetragonioides* (Pall.) O. Kuntze	NL/–
Amaranthaceae	*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.	CL/–
	Chenopodium quinoa Willd.	CL/–
	Chenopodium murale L.	CL/–
	Gomphrena globosa L.	NL/–
Apocynaceae	*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult	–/M
	Plumeria rubra L.	–/M
Brassicaceae	*Brassica rapa* L.	–/–
	Brassica campestris L. ssp. *Chinensis* L. Makino	–/–
Cucurbitaceae	*Cucumis melo* L.	–/–
Fabaceae	*Vicia faba* L.	–/–
Solanaceae	*Capsicum annuum* L.	–/–
		–/–
	C. annuum L. var. *grossum* (L.) Sendtn.	–/–
		–/–
	Capsicum chinense Jacq.	–/–
	C. chinense Jacq. × *Capsicum frutescens* L.	–/–
	C. frutescens L.	–/–
	C. frutescens var. *conoides* (Mill.) L. H. Bailey	–/–
	Datura stramonium L.	CL/–
	Nicotiana benthamiana Domin.	CL/M
	Nicotiana debney Domin.	–/M
	Nicotiana glutinosa L.	–/m
	Nicotiana tabacumcv. ‘Vam-Hicks’	CL/m
	Solanum lycopersicum L.	–/–
		–/m
		–/m
		–/–
	Solanum melongena L.	–/m
		–/m
		–/–

[z] Symptoms on inoculated leaves and upper uninoculated leaves indicated to left and right of slash, respectively. – : no infection; NL: necrotic lesions; CL: chlorotic lesions; M: mosaic; and m: mild or symptomless infection confirmed by ELISA or RT-PCR.

初步鑑定為 PluMV，參考 PluMV 序列，設計引子對如表 2，依圖 2 定序策略進行 DR-TW 基因體全長度之定序。病毒之 5’ 端及 3’ 端之核酸序列則分別以 5’RACE 及 3’RACE 試劑組 (5’RACE/3’RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 增幅，反應條件依試劑組建議之方式進行。再以 FrMV-Rsp-F1/FrMV-CP-R1 增幅replicase small protein (RSP) 及coat protein (CP) 之間的核苷酸序列，黏合溫度為 55℃，延長時間為 5 min，DNA polymerase (Takara Ex Taq DNA polymerase, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 預期生成片段約 5 kb。將前述 PCR 產物委由明欣生物科技有限公司 (台灣台北市) 進行定序。解序所得之序列，以 SeqMan Pro (Lasergene 13, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 進行 contig 組裝。

專一性引子對設計及專一性測試

以定序後 DR-TW 分離株的核苷酸序列為模板，設計專一性引子對 PLuMVcp-up (5’-GAATTTGCTAGAGTCCCAGTTG-3’)/PLuMVcp-dw (5’-AGATGTACCTGCCCCCGAAGTC-3’)，反應溫度及時間如下，先於 95℃反應 5 min，4℃反應 15 min，42℃反應 60 min，95℃反應 15 min，之後再進行 35 個循環 95℃ 15 s、64℃ 15 s、70℃ 60 s，最後再進行 70℃ 10 min。RT-PCR 產物以 1.2% agarose 進行電泳分析，預估可增幅出 643 bp 之產物。為確認 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw 之專一性，取與 DR-TW 同為 *Tobamovirus* 屬的 8 個病毒種：PMMoV、

表 2. 緬梔嵌紋病毒 (PluMV) 全長度基因體定序所設計的引子。

Table 2. Primers used for complete genome sequence of *Plumeria mosaic virus* (PluMV).

Name	Sequence (5’-3’)	Target site	Reference
5’-race AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG	5’-end	5’-RACE
5’-race AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	5’-end	5’-RACE
FrMV-5 race1	AGTTCTAGTGGTATGTCCCA	RSP	This study
FrMV-5 race2	CCTTTCGGAAACCAAACACTC	RSP	This study
FrMV-3 race1	CTCGTTCTTATATTCCTGGCGT	CP	This study
FrMV-3 race2	ACTCAATCCGCTCGGGATGAGT	CP	This study
FrMV-Rsp-F1	AAGCGGACATCGACGACGAGT	RSP	This study
FrMV-CP-R1	ACGCCAGGAATATAAGAACGAG	CP	This study
3’-race AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T_{17})	3’-end	3’-RACE
3’-race AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3’-end	3’-RACE

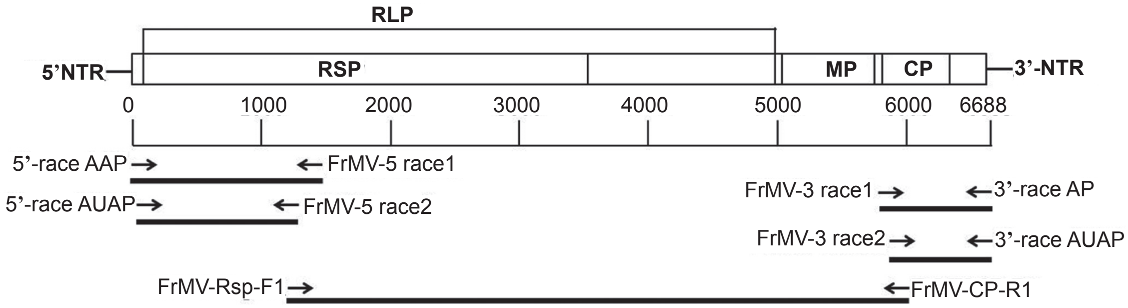


圖 2. 緬梔嵌紋病毒 (PluMV) DR-TW 分離株全長度基因體之解序策略及示意圖。

Fig. 2. Schematic representation of *Plumeria mosaic virus* (PluMV) isolate DR-TW full genome cloning strategies. 5’-NTR: 5’-nontranslated region; RLP: replicase large protein; RSP: replicase small protein; MP: movement protein; CP: coat protein; and 3’-NTR: 3’-nontranslated region.

TMV、ToMV、WMoV、CGMMV、*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)、HLSV 及 FrMV 進行測試。為鑑別 PluMV 與 FrMV。另設計 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up (5'TATTTATTACGCGGTAGTAGTA-3')/FrMVcp-dw (5'-TGAGTCGTAGAGTCTTGACAGA-3')，反應溫度及時間如下，先於 95℃反應 5 min，4℃反應 15 min，42℃反應 60 min，95℃反應 15 min，之後再進行 95℃ 15 s、64℃ 15 s、70℃ 60 s，共 35 個循環，最後再進行 70℃ 10 min。預期片段大小 573 bp，與前述 PluMV 專一性引子對 (PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw)，共同偵測包括 FrMV 及 PluMV 感染的雞蛋花病毒材料 (Lin *et al*. 2018)。

結果

寄主範圍

DR-TW 接種試驗結果如表 1，8 科 25 種植物中，番杏、紅藜、奎藜、綠藜、千日紅及曼陀羅接種後都在接種葉形成局部病斑 (圖 1B–1G)，圓葉菸接種後出現局部病斑以外也發展出系統性嵌紋病徵 (圖 1H)。這些反應與部分 tobamoviruses 的特性相似，但 DR-TW 分離株對番茄、甜椒、辣椒、茄子等的病原性及致病力均弱於 ToMV (Deng *et al*. 2012)。DR-TW 分離株接種 5 棵雞蛋花 (*Plumeria rubra*) 實生苗都產生系統嵌紋，其中之一病徵如圖 1I 所示，其感染可由 ELISA 及 RT-PCR 證實，但翌年病株的病徵全都消失，也無病毒檢出。回接沙漠玫瑰白花及紅花品種，實生苗都產生系統性嵌紋，且病徵歷久不退，甚至延及花器 (圖 1J)，病徵與原來供試樣本相同，也可檢出病毒，茲可證明 DR-TW 為沙漠玫瑰的致病原。

病毒抗體免疫分析

以 ELISA 檢測 DR-TW 與供試 tobamoviruses 抗體的反應，其 ELISA 讀值如表 3 所示，FrMV、TMV、ToMV、WMoV 等抗體可檢出 DR-TW，但與 CGMMV、HLSV、MarMV、ORSV、PMMoV、TMGMV 等抗體則無反應。

以 Western blot 檢測 DR-TW 與供試 tobamoviruses 抗體的反應，其結果如圖 3 所示，利用合成抗原製成的抗體及 ToMV 專一性抗體都可檢出 DR-TW。

病毒核酸檢定

DR-TW 以廣效性引子對 TMVmpf/TMV3nr 進行 RT-PCR，結果未能得到預期片段。

表 3. DR-TW 分離株與其他菸草嵌紋病毒屬病毒抗體反應的 ELISA 讀值。

Table 3. ELISA values (A_{405nm}) of DR-TW reacted with other antibodies to various tobamoviruses.

	Antibody to									
Antigen	CGMMV	FrMV	HLSV	MarMV	ORSV	PMMoV	TMGMV	TMV	ToMV	WMoV
CGMMV	0.304	0.042	0.048	0.008	0.160	0.012	0.005	0.039	0.058	0.387
FrMV	0.009	0.015	0.063	0.013	0.093	0.023	0.076	0.073	0.132	0.194
HLSV	0.022	0.030	0.215	0.578	0.289	0.037	0.012	0.017	0.118	0.084
MarMV	0.000	0.024	0.056	0.020	0.048	0.018	0.001	0.016	0.078	0.088
ORSV	0.011	0.492	0.014	0.089	0.647	0.188	0.200	1.786	0.646	0.321
PMMoV	0.009	0.097	0.056	0.018	0.537	1.028	0.394	0.966	0.266	0.095
TMGMV	0.004	0.015	0.063	0.008	0.095	0.020	0.062	0.023	0.217	0.228
TMV	0.027	0.448	0.051	0.026	0.239	0.075	0.018	1.594	0.353	0.421
ToMV	0.023	0.703	0.027	0.034	0.341	0.196	0.028	1.907	1.263	0.202
WMoV	0.015	0.249	0.057	0.193	0.350	0.059	0.025	0.398	0.030	0.321
DR-TW	0.023	0.628	0.056	0.012	0.178	0.013	0.049	0.460	0.164	0.151
HCK	0.030	0.041	0.049	0.002	0.094	0.026	0.033	0.048	0.050	0.039

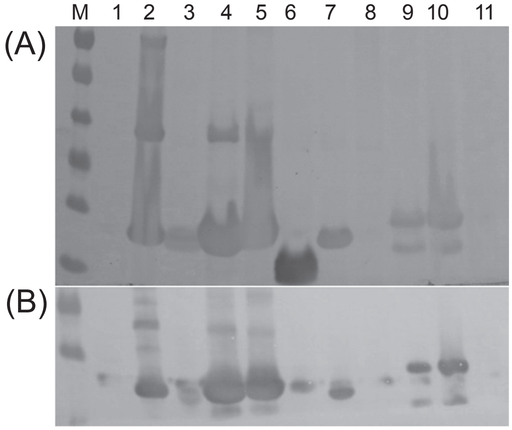


圖 3. 利用 (A) tobamovirus 廣效性多元抗體及 (B) ToMV 抗體與一些菸草嵌紋病毒屬病毒進行西方墨漬法反應的結果。

Fig. 3. Results of Western blot using antibodies (A) to "fusion tobamovirus immunogens", and (B) to ToMV. The tested antigens are indicated on the top of each lane: M (Molecular marker), 1 (HCK), 2 (PMMoV), 3 (TMV), 4 (ToMV), 5 (WMoV), 6 (CGMMV), 7 (ORSV), 8 (HLSV), 9 (DR-TW on desert rose), 10 (DR-TW on *Chenopodium quinoa*) and 11 (CMV on desert rose).

另以引子對 TobRT up1/TobRT do2 進行 RT-PCR，則可增幅出約 568 bp 的核酸片段 (圖 4)。此片段解序後，與 GenBank 中核苷酸序列進行比對，結果顯示 DR-TW 與緬梔嵌紋病毒 (Acc. No. KJ395757) 相同度達 98%。

基因體全長度核苷酸序列定序

以表 2 所列的引子及圖 2 示意的策略，進行 DR-TW 之基因體全長度選殖與定序，所得之基因體序列有 6,683 bp 核苷酸，轉錄出 188.3 kDa 及 130.4 kDa 的複製酶、28.7 kDa 的移動蛋白及 19.0 kDa 的鞘蛋白，包含 4 個 ORFs 分別為 ORF1: methyl-transferase (MT)、helicase (Hel) 及 RNA silencing suppressor domains、ORF2: RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)、ORF3: movement protein (MP)、ORF4: coat protein (CP)，及 5' 端與 3' 端非轉譯區。全序列於 GenBank 上之登錄序號為 Acc. No. KX881422。

親緣分析

利用 MEGA 7.0 之 Neighborhood-joining，

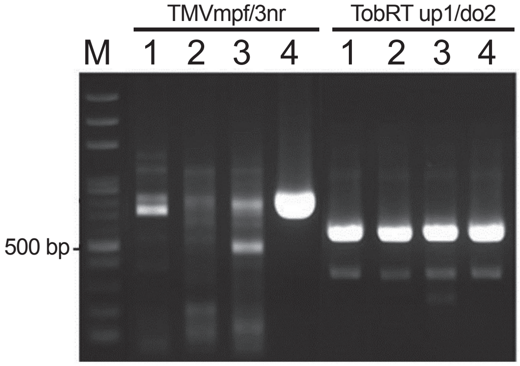


圖 4. 以 TMVmpf/3nr 及 TobRT up1/Tob do2 引子，針對 DR-TW 分離株 (1–4) 進行 RT-PCR 的產物之電泳圖。

Fig. 4. Agarose electrophoreses of the RT-PCR products amplified from isolates of DR-TW (1–4) using primers of TMVmpf/3nr (~800bp) and TobRT up1/Tob do2 (568 bp).

將 DR-TW (Acc. No. KX881422) 與表 4 所列菸草嵌紋病毒屬病毒種的全基因體核苷酸序列繪製成親緣關係樹狀圖 (圖 5)，DR-TW 與印度的 PluMV 分離株 (Acc. No. KJ395757) 相同度達 96.5%、與中國的 FrMV 分離株 (Acc. No. AF165884) 之相同度為 68.3%，與印度的 PluMV 分離株及中國的 FrMV 分離株被歸類於同一群，屬於 Tobamovirus subgroup II 的病毒。將 DR-TW 與 PluMV 及 FrMV 鞘蛋白核苷酸序列 (圖 6 A) 及胺基酸序列 (圖 6 B) 進行多重序列分析，顯示 DR-TW 與 PluMV 具高相同及相似度。綜合以上結果，DR-TW 鑑定為緬梔嵌紋病毒。

專一性引子對測試

為 PluMV 檢測使用，針對其鞘蛋白序列設計一組專一性引子對 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw，並進行專一性測試，結果如圖 7A 所示 DR-TW 增幅出專一性 643 bp 條帶，而 PMMoV、TMV、ToMV、WMoV、CGMMV、ORSV、HLSV 及 FrMV 等則無預期片段產生。取自 DR-TW 增幅出之片段，經定序及比對後，片段與 PluMV (Acc. No. KJ395757) 對應片段相同度達 99%，確認所設計之引子對具專一性。另設計 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up/

表 4. 親緣分析供試菸草嵌紋病毒屬病毒種。

Table 4. List of tested species in genus *Tobamovirus* for phylogenetic analysis.

No.	Species	Accession number
1	*Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV)	AF321057
2	*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)	D12505
3	*Cactus mild mottle virus* (CMMoV)	EU043335
4	*Frangipani mosaic virus* (FrMV)	HM026454
5	*Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV)	AJ295948
6	*Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV)	AF395898
7	*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)	X82130
8	*Plumeria mosaic virus* (PLuMV)	KJ395757
9	*Pepper mild mottle virus* (PMMoV)	M81413
10	*Ribgrass mosaic virus* (RMV)	JQ319720
11	*Tobacco mosaic virus* (TMV)	HE818426
12	*Tomato mosaic virus* (ToMV)	NC_002692
13	*Turnip vein-clearing virus* (TVCV)	U03387
14	*Wasabi mottle virus* (WMoV)	KJ207375
15	*Youcai mosaic virus* (YoMV)	U30944
16	*Zucchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV)	AJ295949

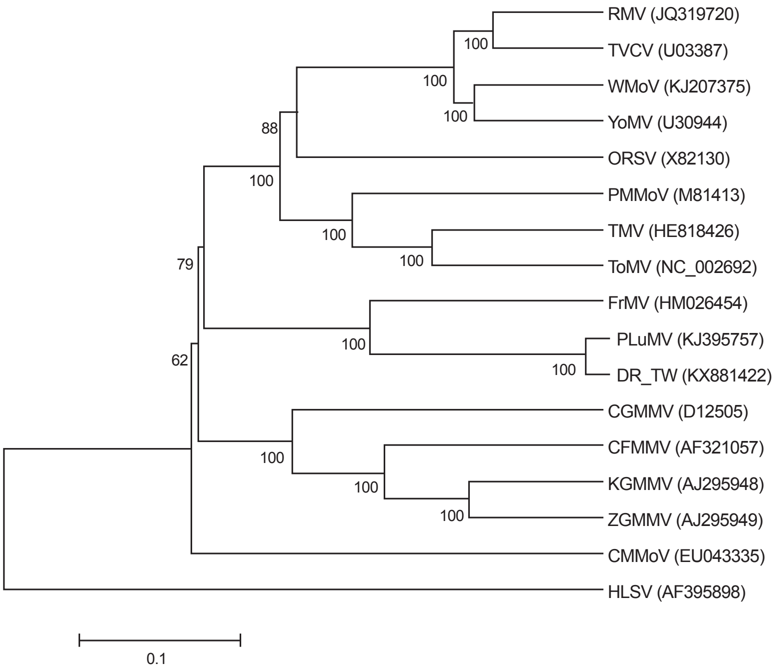


圖 5. 緬梔嵌紋病毒 (PluMV) DR-TW 分離株以 neighborhood-joining method 繪製之全長度基因體親緣分析樹狀圖。

Fig. 5. Phylogenetic analysis of DR-TW (KX881422) and 16 members of the genus *Tobamovirus* based on whole genome sequences. The tree was constructed on MEGA 7.0 by neighborhood-joining method. The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1,000 replications. The following sequences of tobamoviruses for comparisons were obtained from the GenBank database are listed in Table 4.

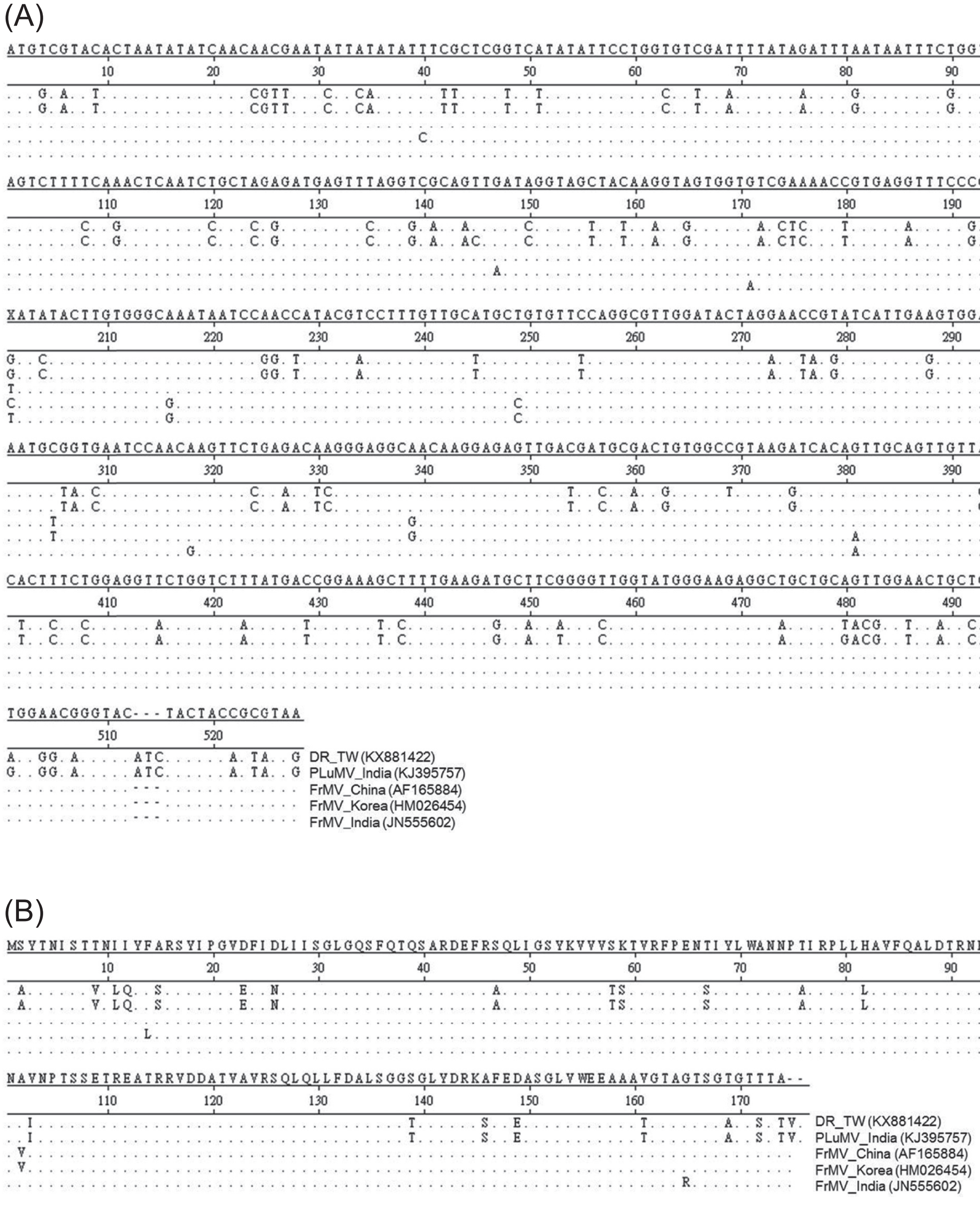


圖 6. 沙漠玫瑰分離株 DR-TW 與緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 及雞蛋花嵌紋病毒 (*Frangipani mosaic virus*) 多重序列比對。

Fig. 6. Multiple sequence alignment of nucleotide sequences (A) and amino acid sequences (B) of coat protein (CP) gene from *Plumeria mosaic virus* (Accession numbers: DR-TW isolate KX881422, India isolate KJ395757) and *Frangipani mosaic virus* (Accession numbers: China isolate AF165884, Korea isolate HM026454, India isolate JN555602).

FrMVcp-dw，專一性測試結果如圖 7B 所示，僅 FrMV 增幅出大小為 573 bp 之專一性條帶，與 PMMoV、TMV、ToMV、WMoV、CGMMV、ORSV、HLSV 及 DR-TW 等則無預期片段產生，此引子對亦具專一性。將 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up/PLuMVcp-dw，與 PluMV 專一性引子對 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw，共同檢測 FrMV 及 PluMV 感染的雞蛋花病毒材料，結果如圖 8，電泳結果可鑑別 PluMV 與 FrMV，在 6 個雞蛋花罹病標本中，檢出 6 個帶有 FrMV，其中 2 個還與 PluMV 複合感染。

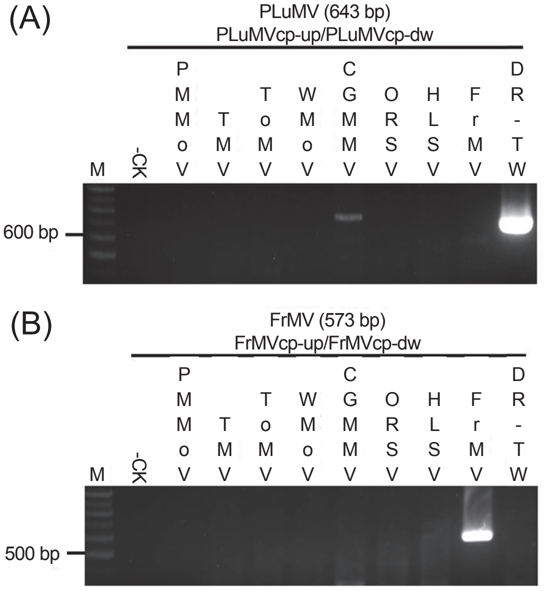


圖 7. 引子對 (A) PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw 及 (B) FrMVcp-up/FrMVcp-dw 專一性測試之電泳圖，供試病毒株包含 PluMV 沙漠玫瑰病毒分離株 (DR-TW) 及另外 8 個 tobamoviruses。

Fig. 7. Agarose electrophoreses of the RT-PCR products amplified from PluMV isolate DR-TW and other 8 tobamoviruses using primers of (A) PluMV-specific PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw and (B) FrMV-specific FrMVcp-up/FrMVcp-dw.

討論

沙漠玫瑰與雞蛋花同屬夾竹桃科 (Apocynaceae)，台灣生物多樣性資訊網 (TaiBIF) (http://taibif.tw/zh/namecode/418312) 稱英文俗名 frangipani 的植物為雞蛋花，學名為 *Plumeria rubra* L.，而稱 *Plumeria* 為緬梔屬。沿此，FrMV 中文應譯為雞蛋花嵌紋病毒，而 PluMV 的中文譯名則稱為緬梔嵌紋病毒。

PluMV 的首發記錄於印度的雞蛋花 (Kumar *et al*. 2013)，並在 2016 年被 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 接受為 *Tobamovirus* 屬的一病毒種，屬於 *Virgaviridae* 科 (Adams *et al*. 2017)。至目前為止，GenBank 內 PluMV 的全基因體序列只有 3 筆，除了印度的 isolates (NC_026816 及 KJ395757) 外，來自台灣的 DR-TW (KX881422) 為另外唯一的紀錄，而 DR-TW 卻是從沙漠玫瑰分出來的，因此本研究是 PluMV 感染沙漠玫瑰的首發報告。

FrMV 文獻早有完整的紀錄 (Varma & Gibbs 1978)，在台灣也發生於雞蛋花上 (Cho-

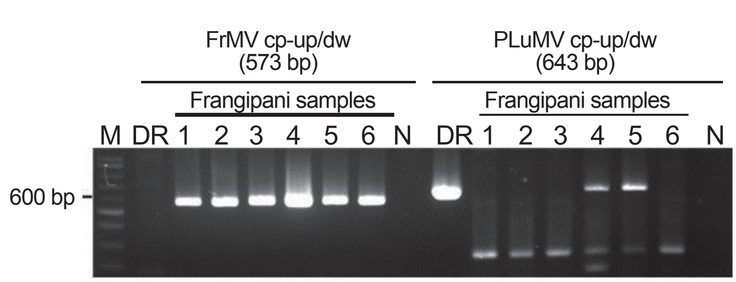


圖 8. 利用 2 組專一性引子對 FrMVcp-up/FrMVcp-dw 及 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw 分別檢測田間雞蛋花罹病樣本 (1–6) 之電泳圖。

Fig. 8. Agarose electrophoreses of the RT-PCR products amplified from diseased frangipani samples (1–6) using specific primers of FrMVcp-up/FrMVcp-dw and PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw. All 6 samples were positive to FrMV and 2 of them were also positive to PluMV. DR: PluMV isolate DR-TW; N: water for negative control.

liq *et al*. 2014)。至於感染沙漠玫瑰的病毒，曾有 CMV 的發生報告 (Chen *et al*. 2012)。鄭志文曾首次從沙漠玫瑰分離出桿狀病毒，但未完成病毒種的鑑定 (Zheng 2011)。作者以菸草嵌紋病毒屬廣效性引子對 TMVmpf/TMV3nr 進行 RT-PCR，結果未能得到預期結果。再引用 Choliq *et al*. (2014) 的廣效性引子對進行 RT-PCR，雖可增幅出 568 bp 的核酸片段，但其序列與 FrMV 的 AF165884、JN555602 及 HM026454 之對應片段相同度最高都只達 79–80%，未能完成種的鑑定 (Deng *et al*. 2015)。本研究進一步分析 DR-TW 的 CP 基因，經與 PluMV 印度分離株的 KJ395757 比對，其相對片段相同度高達 99.1%。再經設計引子，逐步完成核酸全長解序後，DR-TW 與 PluMV (KJ395757) 基因體相似度為 98%，證實 DR-TW 屬於 PluMV。

PluMV 分離株 DR-TW 雖如 TMV 或 ToMV 可感染判別寄主的番杏及藜科植物，但結果顯示其對茄科作物的致病力並不高，接種試驗中對各種供試番椒、瓜類、豆類及十字花科植物都無病原性，因此 PluMV 的發生對經濟作物較無風險。

PluMV 分離株 DR-TW 對 FrMV 的抗體有交互反應，且親緣分析顯示與 FrMV 歸屬同一群。應用 TMV、ToMV 及廣效性 tobamovirus 抗體都可在免疫反應中偵測出 PluMV。

同時應用專一性引子對 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw 及 FrMVcp-up/PLuMVcp-dw 可鑑別 PluMV 及 FMV，初步調查雞蛋花除 FrMV (Choliq *et al*. 2014) 以外，PluMV 也有發生單獨或與 FrMV 複合感染狀況 (Lin *et al*. 2018)。

本研究所應用的病毒抗體檢驗方法與試劑，以及其中所發展的 RT-PCR 技術都可提供到沙漠玫瑰及雞蛋花健康種苗的篩檢，用以建立永續的健康花圃。

誌謝

感謝行政院農業委員會高雄區農業改良場陳明吟助理研究員採集沙漠玫瑰罹病材料。

引用文獻

Adams, M. J., E. J. Lefkowitz, A. M. King, B. Harrach, R. L. Harrison, N. J. Knowles, A. M. Kropinski, M. Krupovic, J. H. Kuhn, A. R. Mushegian, M. Nibert, S. Sabanadzovic, H. Sanfacon, S. G. Siddell, P. Simmonds, A.Varsani, F. M.Zerbini, A. E. Gorbalenya, and A. J. Davison. 2017. Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). Arch. Virol. 162:2505–2538.

Chen, Y. K., Y. S. Chang, Y. W. Lin, and M. Y. Wu. 2012. First report of *Cucumber mosaic virus* in desert rose in Taiwan. Plant Dis. 96:593.

Choliq, F. A., T. H. Chen, and L. Sulistyowati. 2014. Molecular characterization of a rigid rod-shaped virus isolated from frangipani (*Plumeria* sp.) showing mosaic symptom in Taiwan. J. Exp. Life Sci. 7:1–6.

Chou, C. M., C. T. Chen, C. H. Tsai, C. C. Chen, and T. C. Deng. 2018. Immunogenicity of tobamovirus universal antibodies raised against expressed protein encoded by a synthetic polynucleotide containing epitope genes of ToMV, ORSV and CGMMV. J. Taiwan Agric. Res. 67:301–308.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen.Virol. 34:475–483.

Deng, T. C., M. C. Chen, C. H. Tsai, Y. T. Lin, and J. Y. Liao. 2011. The occurrence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* and *Hibiscus latent Singapore virus* in Malvaceae plants in Taiwan. p.V05. *in*: Abstract of 2010 Annual Meeting of Taiwan Phytopathological Society. March 25–26, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Phytopathol. Soc., Taichung, Taiwan. (in Chinese)

Deng, T. C., Y. T. Lin, C. H. Tsai, J. Y. Liao, Y. H, Cheng, Z. H. Lee, C. C. Shih, and Y. C. Chen. 2012. Identification and occurrence of a *Tomato mosaic virus* infecting pepino (*Solanum muricatum*) plants in Penghu, Taiwan. Plant Prot. Bull. 54:47–64. (in Chinese with English abstract)

Deng, T. C., C. H. Tsai, Y. H. Chien, M. J. Lin, and M. Y. Chen. 2015. Characterization of a tobamovirus isolated from desert rose (*Adenium obesum*) in Kaohsiung, Taiwan. Plant Path. Bull. 24:152–153. (in Chinese)

Deng, T. C., C. H. Tsai, and F. Y. Ning. 2016. Identification of *Wasabi mottle virus* infecting wasabi in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65:103–108. (in Chinese with English abstract)

Dovas, C. I., K. Efthimiou, and N. I. Katis. 2004. Generic

detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. J. Virol. Methods 117:137–144.

Huang, J. G., C. L. Deng, Z. F. Fan, G. Z. Tian, and H. F. Li. 2004. Isolation and identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Syringa oblata*. Acta Phytopathol. Sin. 34:215–220.

Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55:53–62.

Kumar A., V. Solanki, and B. Madal. 2013. *Frangipani mosaic virus* and *Plumeria mosaic virus*: Identification and comparison of two tobamovirus infecting frangipani in India. *in*: Proceeding of the Asia-Pacific Congress of Virology. December 17–20, 2013. Indian Virol. Soc., Nodia, India.

Liao, J. Y., C. C. Hu, J. L. Kao, and T. C. Deng. 2007. Identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Rehmannia glutinosa*. Plant Pathol. Bull. 16:61–69. (in Chinese with English abstract)

Lin, Y. T., C. H. Tsai, M. J. Lin, Y. H. Chien, and T. C. Deng. 2018. Isolation and identification of *Plumeria mosaic virus* from desert rose and plumeria in Taiwan. J. Plant Med. 60(3–4):66–67. (in Chinese)

Towbin, H., S. Theophil, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:4350–4354.

Varma, A. and Gibbs, A. J. 1978. *Frangipani mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.196. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=196 (visit on 08/20/2019)

Zheng, Z. W. 2011. Characterization of a rigid-rod-shaped virus isolated from desert rose [*Adenium obese* (Forssk.) Roem. & Schult.] showing mosaic symptom in Taiwan. Master Thesis, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung, Taiwan. 57 pp. (in Chinese with English abstract)

Identification and Detection of *Plumeria mosaic virus* Infecting Desert Rose (*Adenium obesum*)

Yi-Ting Lin[1], Chin-Hui Tsai[1], Mei-Ju Lin[2], and Ting-Chin Deng[3,*]

Abstract

Lin, Y. T., C. H. Tsai, M. J. Lin, and T. C. Deng. 2020. Identification and detection of *Plumeria mosaic virus* infecting desert rose (*Adenium obesum*). J. Taiwan Agric. Res. 69(1):77–89.

A diseased sample of desert rose (*Adenium obesum*) cv. Dahuahua showing virus-like symptom was found in Kaohsiung in 2013. The pure virus isolate (DR-TW) was obtained by inoculation to *Chenopodium quinoa* through single lesion transfer. Immunoassay showed that the isolate interacted crossly with the other tobamoviruses, including *Frangipani mosaic virus* (FrMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), etc. After sap inoculation, local lesions were developed on leaves of *Tetragonia tetragonioides*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium murale*, *Gomphrena globosa* and *Datura stramonium*; and systematic mosaic was showed on plants of *Nicotiana benthamiana*, frangipani and desert rose. However, the pathogenicity and virulence of DR-TW was milder than ToMV to tomatoes, peppers and eggplants. A pair of tobamovirus broad-spectrum primers (TobRT up1/TobRT do2) were applied in RT-PCR to amplify a nucleic acid fragment with 568 bp. Sequence alignment revealed that the RT-PCR fragment shared more than 98% identity with *Plumeria mosaic virus* (PluMV) but only 73% with FrMV. Another primers were designed and used for analysis of complete genome. The full length of genomic nucleotides with 6,683 bp was determined and deposited in GenBank under accession number KX881422. A total of 188.3 kDa and 130.4 kDa of replicates, 28.7 kDa of movement protein and 19.0 kDa of coat protein, were transcribed. A pair of PluMV-specific primers (PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw) were designed to amplify a fragment of 643 bp nucleotides by RT-PCR, by which PluMV was detectable and could be distinguished from other tobamoviruses. The FrMV specific primers (FrMVcp-up/FrMVcp-dw) were also applied to differentiate the FrMV from PluMV by RT-PCR.

Key words: Taiwan, Isolate, *Tobamovirus*, *Frangipani mosaic virus*.

Recieved: August 20, 2019; Accepted: October 25, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw

[1] Project Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):90–100 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0007 研究報告

市售溶磷菌肥料產品品質分析

林素禎[1,*] 林姿君[2] 簡宣裕[3]

摘要

林素禎、林姿君、簡宣裕。2020。市售溶磷菌肥料產品品質分析。台灣農業研究 69(1):90–100。

高品質的微生物肥料才能在田間提高植物營養元素的吸收及促進植物生長，而政府的品質管控有助於微生物肥料產品在田間獲得更好及更一致的結果，而且還可以從市場上去除品質差的產品，進而提高農民使用的信心。本文闡述行政院農業委員會農業試驗所於 2017 年及 2018 年購買市面上販售溶磷菌肥料產品的檢測結果，包括溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環、溶磷活性及菌種鑑定，其檢測方法參考行政院農業委員會農糧署公告的「肥料檢驗項目之檢驗方法」。由 2017 年檢測結果可知，農業試驗所由市面上購得的 14 個溶磷菌肥料產品，僅有 5 個皆符合農糧署微生物肥料規定，合格率為 36%。由 2018 年檢測結果可知，16 個市售溶磷菌肥料產品只有 8 個皆符合規定，合格率為 50%。上述檢測結果，乃國內微生物肥料產品上市以來第一次全面性的品質分析，該分析資料可提供農糧署在微生物肥料產品品質管控及未來微生物肥料法規修改之參考。

關鍵詞：微生物肥料、溶磷菌、品質管控。

前言

行政院農業委員會農糧署自 2008 年起推動合理化施肥至 2014 年止，經由合理施用化學肥料，每年業已減少化學肥料施用量 10.7%，平均每年約減少 12 萬公噸 (農糧署農業統計年報 2002−2014 年，http://www.afa.gov.tw)。未來擬再藉由施用有機質肥料與微生物肥料，期能再次降低化學肥料之施用量。

微生物肥料 (biofertilizer) 的商業化生產始於 1895 年，在美國和英國開始生產豆科植物用的根瘤固氮菌接種劑。至 1993 年，根瘤固氮菌接種劑在世界各大洲許多國家都有生產 (Brockwell & Bottomley 1995)。化學肥料與有機質肥料可用肥料成分來標示其養分之高低，而微生物肥料中除了固氮菌可直接提供作物氮肥外，其他種類的微生物肥料都是藉由增進土壤養分有效性或改良土壤之理化、生物性質，進而增加作物產量及品質者。所以，微生物肥料的必要檢驗項目，與化學肥料、有機質肥料迥然不同。印度在 1996 年提出了溶磷菌與固氮菌 (*Azospirillum*) 的產品標準規範，標準規範中包括菌種名稱、出廠時之菌數、保存期限到期時之菌數、雜菌率、保存期限、pH 值、水分含量、定量的活性指標、載體種類、載體大小定量指標 (Ghosh *et al*. 2001)。目前國內的微生物肥料產品登記時需提供菌種名稱、出廠時之目標菌株有效活菌數、活性、大腸桿菌群、雜菌率、保存期限等，但微生物肥料產品規格中未有定量的微生物肥料活性與載體大小之規定，且無需提供微生物肥料的肥 (功) 效試驗報告。

Catroux *et al*. (2001) 報導指出世界各地 90% 的豆科根瘤菌產品沒有實際的效果，主

投稿日期：2019 年 6 月 4 日；接受日期：2019 年 11 月 17 日。
[*] 通訊作者：linmay@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所農業化學組計畫助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所農業化學組前研究員。台灣 台中市。

要是因產品的品質不佳。Herrmann & Lesueur (2013) 報導指出 65 個微生物產品中，只有 37% 的產品是 “純的” 微生物菌劑，而其他 63% 的產品被雜菌污染，且 40% 的產品中沒有指標微生物。法國根瘤菌產品品管法規最嚴格，每粒種子的菌數需在 10^6 CFU 以上，且從出廠到儲架期間皆需無污染，其產品每季使用前皆需經過檢定 (Herrmann & Lesueur 2013)。

微生物肥料品質好壞直接影響到施用效果，目前我國微生物肥料產品販售前需先取得農糧署許可證號才能進行販售，而要取得農糧署許可證號，微生物肥料產品必須要先經過檢驗單位檢驗合格。微生物肥料產品檢驗之採樣現行都是取剛製造完成之產品，而微生物肥料產品從出廠到儲架期間，其品質在保存期限內是否還能維持，則有待國內政府機關定期抽樣檢驗才能知道實際狀況。從 2018 年起，農糧署及各縣市政府開始進行微生物肥料產品抽樣與檢驗，希望能在微生物肥料產品品質上進行把關。行政院農業委員會農業試驗所在 2017 與 2018 兩年間，購買市售溶磷菌肥料產品進行檢測，本文中將根據農糧署公告的微生物肥料檢驗項目，評估這些溶磷菌肥料產品之品質。

材料與方法

農業試驗所於 2017 年與 2018 年購買市面上販售的溶磷菌肥料產品，進行溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環、溶磷活性等之檢測及菌種鑑定，其檢測方法參考農糧署公告的「肥料檢驗項目之檢驗方法」。溶磷菌有效活菌數及溶磷活性檢驗方法編號為 AFS3183-1，雜菌率檢驗方法編號為 AFS3802-1，溶磷菌肥料產品之菌種鑑定方法編號為 AFS3001-1。(https://www.afa.gov.tw/cht/index.php?code=list&flag=detail&ids=740&article_id=5725)。另外，目前國內在微生物肥料限制事項中只有大腸桿菌群檢測，2017 年農業試驗所委託弘光科技大學食品與化妝品品質檢驗與分析中心檢測市售 14 個溶磷菌肥料產品之大腸桿菌群、大腸桿菌及沙門氏菌，其檢驗方法參考衛福部公告食品微生物之檢驗方法 (大腸桿菌群之檢驗、大腸桿菌之檢驗及沙門氏桿菌之檢驗)。本文中溶磷菌肥料產品各項的檢測方法簡述於下。

溶磷菌有效活菌數、雜菌率及溶磷環測定

取 10 g (或 10 mL) 溶磷菌肥料產品放入容積 250 mL 已滅菌三角瓶中，加入 90 mL 已滅菌之冷稀釋液中，即為 10× 稀釋檢液 (亦稱 10^{-1} 稀釋度檢液)。上述冷稀釋液為生理食鹽水，其配製方法如下：將 8.5 g NaCl 溶解於蒸餾水中，然後稀釋定量成 1 L 經滅菌後備用。將裝有 10× 稀釋檢液之三角瓶置於迴轉振盪器上，以 30℃、200 rpm 轉速振盪 20 min，使其混合均勻。振盪後，樣品若為粒劑，需於桌面靜置 30 s 後，再行稀釋。吸取 1 mL 之 10× 稀釋檢液，移入 9 mL 冷稀釋液之螺旋試管中，振盪均勻，即為 10^2× 稀釋檢液 (亦稱 10^{-2} 稀釋度檢液)。依序稀釋至所需稀釋度，本操作需製作不添加溶磷菌肥料產品之空白對照組。取 0.1 mL 適當稀釋度之菌檢液置於培養基表面中央處 (若預估菌液之活菌數為 10^9 CFU mL^{-1}，則採用 10^5–10^7 倍稀釋檢液；依此類推)，立即取滅菌之玻璃塗抹棒，將菌液均勻塗抹在培養基表面。確認培養基表面無菌液流動後，將培養皿倒置於生長箱內 30℃黑暗培養，分別於第 3 天、第 7 天、第 14 天及第 28 天，選擇每皿菌落數在 25–250 之稀釋度計算菌落數，溶磷菌有效活菌數 (CFU g^{-1} 或 CFU mL^{-1}) = 平均菌落數 (CFU 皿 $^{-1}$) × 稀釋倍率/稀釋菌液量 (g 皿 $^{-1}$ 或 mL 皿 $^{-1}$)。雜菌係指不屬於微生物肥料目標菌種 (溶磷菌) 之其他微生物，依菌落特徵判定雜菌數，計算微生物肥料雜菌率，雜菌率 = 雜菌數 × (雜菌數 + 溶磷菌數)$^{-1}$ × 100%。溶磷菌菌落周圍可形成透明環，測量溶磷菌菌落形成透明環之直徑，以每一菌落最長與最短之直徑，取其平均值代表溶磷菌菌落之溶磷環直徑。上述溶磷菌培養基如表 1 所示，每個直徑 9 cm 培養皿有 13 mL 培養基，平板培養基厚度約 2 mm。

溶磷活性

取 1 g (或 1 mL) 溶磷菌肥料產品加入 100 mL 液體培養基中，在 30℃、200 rpm 培養箱

表 1. 溶磷菌固體培養基 [z]。

Table 1. Culture medium for phosphate-solubilizing bacteria[z].

Composition	Concentration ($g\ L^{-1}$)	Company name
Sucrose	10.000	Choneye, Taiwan
NH_4NO_3	0.270	Katayama, Japan
KCl	0.200	Katayama, Japan
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.100	Katayama, Japan
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001	Katayama, Japan
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.001	Merck, Germany
Agar	15.000	Becton, Dickinson and Company, BD, USA
$Ca_3(PO_4)_2$	5.000	Katayama, Japan
Distilled water	Added to 1,000 mL	

[z] Medium pH was adjusted to 7.0 ± 0.1, and then sterilized at 121℃ for 15 min.

中振盪培養 4 d，另取 1 g (或 1 mL) 經滅菌處理之溶磷菌肥料產品為對照組。上述溶磷菌液體培養基之組成不含瓊脂 (agar)，其餘與表 1 相同。培養後，將培養液置於高速離心機中離心 20 min (5℃配合 27,000× *g* 條件)，取澄清液，並以 0.45 μm 濾膜過濾。取定量濾液 (磷約 100−900 μg) 移至 50 mL 量液瓶中，加入 10 mL 混合試劑，以去離子水稀釋定量。混勻並靜置 1 h 後，以波長 420 nm 分光光度計測定磷濃度。磷標準曲線製作方法如下：取 0、5、10、15、20 及 25 mL 之 50 mg L^{-1} 磷標準溶液，分別加入 50 mL 量液瓶中，並各加入 10 mL 混合試劑後以去離子水稀釋定量至 50 mL。混勻後即為 0、5、10、15、20 及 25 mg L^{-1} 之磷濃度，靜置 1 h 後，以分光光度計測定，並製作標準曲線。依標準曲線所得之溶磷菌肥料產品磷濃度，計算磷含量。溶磷活性是指單位重量 (體積) 溶磷菌肥料產品之溶磷菌，在單位時間內將難溶性磷分解為水溶性磷之量 μg $[g\ (mL) \times h\ (d)]^{-1}$，溶磷活性 = 溶磷菌肥料產品之培養液所含水溶性磷量 (μg 瓶 $^{-1}$) − [滅菌的溶磷菌肥料產品之培養液所含水溶性磷量 (μg 瓶 $^{-1}$)] / [使用溶磷菌肥料產品量 (mL 瓶 $^{-1}$ 或 g 瓶 $^{-1}$) × 培養時間 (h 或 d)]。上述混合試劑的配製方法如下：將偏釩酸銨溶液移入 1,000 mL 量液瓶中，快速攪拌，並緩慢加入 250 mL 濃硝酸 (HNO_3)。冷卻至室溫後，將鉬酸銨溶液倒入量液瓶中，定量至 1,000 mL。上述鉬酸銨溶液為取 25 g 鉬酸銨 $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$ 溶解於 400 mL 去離子水中後備用；偏釩酸銨溶液為取 1.25 g 偏釩酸銨 (NH_4VO_3) 溶解於 300 mL 之沸騰去離子水中，冷卻至室溫供用；50 mg L^{-1} 磷標準溶液製作為以 KH_2PO_4 先於 40℃下乾燥，正確稱取 0.2197 g 後，加入去離子水及 25 mL 3.5 M 硫酸液，再加去離子水至 1,000 mL，此時磷濃度即為磷 50 mg L^{-1}，亦可採用市售磷標準溶液。上述 3.5 M 硫酸液製作為緩慢將 194 mL 濃硫酸，加入 500 mL 去離子水中，再稀釋為 1,000 mL，冷卻備用。

溶磷菌肥料產品之菌種鑑定

溶磷菌肥料產品目標溶磷菌菌體之基因組 DNA (genomic DNA) 分離：先將低溫保存之目標溶磷菌菌體樣品進行 10× 連續稀釋，取 1 mL 目標溶磷菌菌體樣品與 9 mL 滅菌水混合，製備 10^{-1}−10^{-8} 濃度之稀釋液。再取 100 μL 稀釋液，均勻塗抹於 nutrient agar (NA) 培養基中，於 30℃下恆溫培養約 3−7 d。nutrient broth (NB) 培養基中外加 17 g L^{-1} 瓊脂後為 NA 培養基。挑選單一菌落後，至少進行 3 次劃線分離，確定挑選之菌株為純系培養者。將挑選之純系培養菌株分別接種至 5 mL 之 NB 液體培養基中，於 30℃配合轉速 180 rpm 之恆溫振盪條件下，培養 4 d。取 1.5 mL 之上述菌液，加入一個經滅菌之 2 mL 微量離心管中，再將微量離心管置入可控溫高速微量離心機中，於 4℃配合 10,000× *g* 之條件下高速離心 30 s，將菌體離心至微量離心管之管壁上。倒掉培養液後，再於 4℃配合 10,000× *g* 之條件下高速離心 30 s，以微量吸取器小心移除殘留之上清液。接著，以萃取試藥套組 (UltraClean Microbial DNA Isolation Kit) 萃取基因組 DNA。萃取試藥套組含 microbead solution、microbead tube、Solution 1、Solution 2、Solution 3、Solution 4、Solution 5 及 spin filter。上述微量離心管去除上清液後，加入 300 μL microbead solution，將黏附於管壁之菌體沖起並輕微振盪，再將溶液連同菌體移至mi-

crobead tube 中。加入 50 µL Solution 1 於 microbead tube 中。將 microbead tube 置於水浴槽中，以 70℃加熱 10 min。將 microbead tube 置於振盪旋轉盤上，調整轉速至最大刻度後振盪 10 min。將 microbead tube 置於微量離心機中，並以 10,000× *g* 離心 30 s。以微量吸取器將上清液移至一新的 2 mL 微量離心管中，加入 100 µL Solution 2 於微量離心管中，上下搖動 5 s，使其與上清液充分混合，並置於 4℃條件下 5 min。將微量離心管置於微量離心機中，並以 10,000× *g* 離心 1 min。以微量吸取器將上清液移至一新的 2 mL 微量離心管中，加入 900 µL Solution 3 於微量離心管中，上下搖動 5 s，使其與上清液充分混合。取 700 µL 上述混合液，並移至含有 spin filter 之微量離心管，並將微量離心管置於微量離心機中，以 10,000× *g* 離心 30 s。將微量離心管中蒐集之濾液倒掉後，再將剩餘混合液 700 µL 移至含有 spin filter 之相同微量離心管，並將微量離心管置於微量離心機中，以 10,000× *g* 離心 30 s 後，再倒掉濾液。加入 300 µL Solution 4 於上述之微量離心管的 spin filter 上，並將微量離心管置於微量離心機中，以 10,000× *g* 離心 30 s。將微量離心管中蒐集之濾液倒掉後，再將微量離心管置於微量離心機中，以 10,000× *g* 離心 1 min 後，再去除殘液。將 spin filter 移至一新的 2 mL 微量離心管中，加入 50 µL Solution 5 於 spin filter 中央。將含有 spin filter 之微量離心管置於微量離心機後，以 10,000× *g* 離心 30 s，將 spin filter 取出後，此時微量離心管中的濾液即含有萃取之基因組 DNA，將含有基因組 DNA 之離心管儲存於 -20℃冰箱中，以供聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 增殖 16S 核醣體 DNA (16S rDNA) 用。

溶磷菌菌體 16S 核醣體 DNA (16S rDNA) 之 PCR 擴增方法

本試驗使用 16S rDNA 細菌通用引子對 11F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3', Kane *et al.* 1993) 及 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3', Lin & Stahl 1995)。將引子對回溶後，以桌上型低轉速離心機離心 3 s 後，放置冰上備用。吸取 0.5 µL 10 mM 11F 引子與 0.5 µL 10 mM 1492R 引子，再加入 0.25 µL μL^{-1} Taq DNA 聚合酶，2 µL 2.5 mM dNTPs，2.5 µL 10× 之聚合酶緩衝溶液，以及測試菌株之基因組 DNA 約 3 ng，於 PCR 專用塑膠管中。最後添加去離子水使總體積為 25 µL，即可進行聚合酶鏈鎖反應以擴增 DNA，其熱循環條件如下：最初變性 95℃ 10 min，使基因組 DNA 完全打開，接著每個循環設定的條件為變性 95℃ 50 s，黏接 53℃ 60 s，延展 72℃ 120 s，變性至延展需進行 28 個循環反應，最終延展 72℃ 10 min。然後，將 PCR 增殖後之 16S rDNA，儲存於 -20℃冰箱中備用。

DNA 膠體電泳分析

以 0.5× TAE 緩衝液配製 0.8% 洋菜膠 (agarose)，並以微波爐加熱溶解後於室溫靜置冷卻至 40−55℃，倒入製膠台凝固。待完成後，將洋菜膠放入電泳槽中，並倒入適量之 0.5× TAE 緩衝液使其完全覆蓋膠體。吸取 5 µL 增殖後的 16S rDNA，並與 1 µL 6× EZ-Vision DNA 染劑 (DNA dye as loading dye) 混合均勻後，隨即注入膠體孔洞中。接著在 16S rDNA 樣品一側注入 2 µL 1 Kb DNA 分子量標記 (DNA molecular weight marker)，用來比對 16S rDNA 樣品之分子量。電泳條件為 100 V，經 25−30 min，完成後將膠體置於 UV 照光拍攝系統內，觀察結果並拍照記錄。

16S rDNA 序列定序與分析

16S rDNA 經 PCR 擴增並以膠體電泳確認後，委由明欣生物科技公司 (台灣台北市) 以自動核酸定序儀進行 DNA 定序分析，定序引子對為 11F 和 1492R 引子，定序結果以 BioEdit 軟體進行序列比對與組合。將上述已組合之核醣體 DNA 序列，在 EzBioCloud 網站中與標準菌株之 16S rDNA 序列進行比對，所得之序列相似度作為微生物鑑定之判讀依據。另外，亦將廠商在申請溶磷菌肥料產品登記證時所提供的目標菌株 16S rDNA 序列，在 EzBioCloud 網站中與標準菌株之 16S rDNA 序列進行比對，所得之菌種名稱與上述結果比較是否為同一菌種。

結果

2017 年市售溶磷菌肥料產品品質分析

2017 年農業試驗所由市面上購得 14 個溶磷菌肥料產品，其溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環、溶磷酸鈣活性檢測及菌種鑑定結果，如表 2 所示。依據農糧署 2013 年 4 月 3 日修正之肥料種類品目及規格中規定，市售溶磷菌肥料產品之有效活菌數為固態每公克 1×10^7 菌落形成數以上；液態每毫升 1×10^8 菌落形成數以上，肥料登記與市售品查驗之容許差限值為菌落形成數無上限，下限為肥料登記值之 1/10。由此可知，市售溶磷菌肥料產品溶磷菌有效活菌數，除了需符合規定的菌落形成數以上，尚須符合下限為肥料登記值之 1/10 才算合格，目前農糧署網站中並未公告已登記的溶磷菌肥料產品之溶磷菌有效活菌數登記值。由檢驗結果 (表 2) 可知，產品編號 1、5、12、13 與 14 的溶磷菌有效活菌數未達固態每公克 1×10^7 菌落形成數以上之規定，判定為不合格之產品，不合格率為 36%。產品編號 1、5 與 14 在產品登記時，溶磷菌有效活菌數所用檢測方法為農糧署公告方法 AFS3183-1，產品編號 12 與 13 在產品登記時，所用檢測方法為經濟部標準檢驗局 CNS15301-3，其培養基配方中瓊脂 (agar) 為 12 g L^{-1}，磷酸鈣 [$Ca_3(PO_4)_2$] 為 0.3 g L^{-1}。農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中瓊脂為 15 g L^{-1}，磷酸鈣 [$Ca_3(PO_4)_2$] 為 5 g L^{-1}，其他培養基成分與用量皆相同。培養基配方中的瓊脂含量與磷酸鈣含量是否會影響溶磷菌有效活菌數，需要進一步探討。

在雜菌率檢測方面，農糧署之肥料種類品目及規格中規定，溶磷菌肥料固態產品雜菌率不得超過 15%，液態產品雜菌率不得超過 5%。由檢驗結果 (表 2) 可知，14 個市售溶磷菌肥料產品中，雜菌率皆符合農糧署規定。

在溶磷環檢測方面，農糧署之肥料種類品目及規格中並無溶磷環之規定。有關定量的活性指標目前只有印度的資料，其規定為：以分光光度法檢測時，菌株應具有最小 30% 的溶磷能力，以溶磷環檢測時，在厚度至少為 3 mm 的培養基上形成最小 5 mm 溶磷環。若以印度的溶磷環基準 (Ghosh *et al*. 2001) 來看，14 個市售溶磷菌肥料產品之溶磷環皆不符合規定。其中，產品編號 3、9、10、12 與 13 等 5 個產品，皆沒有產生溶磷環。

在溶磷菌活性檢測方面，農糧署之肥料種類品目及規格中溶磷菌活性無定量指標，只要有活性即可。由檢驗結果 (表 2) 可知，產品編號 3、7、10 與 11 的溶磷菌活性皆為負值，依農糧署的規定判定為不合格之產品，14 個溶磷菌肥料產品不合格率為 29%。產品編號 3 在產品登記時，溶磷菌活性檢測方法為調整的磷酸鈣培養基，其培養基配方以農糧署公告方法為基礎，將碳源調整為葡萄糖，另外添加 0.1g 酵母抽出物。產品編號 7 在產品登記時，所用的檢測方法為農糧署公告方法。產品編號 10 與 11 在產品登記時，檢測方法為經濟部標準檢驗局 CNS15301-3，其溶磷菌活性培養基配方中的磷酸鈣 [$Ca_3(PO_4)_2$] 為 0.3 g L^{-1}，而農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中的磷酸鈣 [$Ca_3(PO_4)_2$] 為 5 g L^{-1}，其他培養基成分與用量皆相同。培養基配方中的碳源種類、酵母抽出物添加與磷酸鈣含量是否會影響溶磷菌活性，需要進一步探討。

在菌種鑑定方面，若將 14 個溶磷菌肥料產品之目標溶磷菌菌株已組合的 16S rDNA 序列，以 NCBI 核酸序列資料庫比對，同一個產品的菌株序列可以得到許多序列相似度完全相同但不一樣的菌種名稱。在這些序列相似度最高的菌種名稱當中，皆可找到廠商所登記的菌種名稱，但無法判定哪一個可代表該菌株之菌種名稱。因此，再將 14 個溶磷菌肥料產品之目標溶磷菌菌株已組合的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中標準菌株的 16S rDNA 進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱 (如表 2)。另外，亦將廠商在產品上所標示的目標菌株菌種名稱，及產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列與 EzBioCloud 網站中標準菌株的 16S rDNA 進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱列於表 2。由表 2 中可知，產品編號 1、2、4、5、6、8 及 14 等 7 個產品，在產品上所標示的目標

表 2. 2017 年市售溶磷菌肥料產品品質分析。

Table 2. Commercial product quality analysis of phosphate-solubilizing bacteria in 2017.

Sample no.	Plate count[z]	Contamination rate[y] (%)	Phosphate solubilizing halo zone (mm)	Tricalcium phosphate solubilizing activity [μg g^{-1} (mL^{-1}) day^{-1}]	Species name of target strain on product label	Species name based on rDNA sequence data when product was registered[x]	Species name of products bought from market in 2017 and identified by rDNA sequence[w]
1	7.3×10^6 CFU g^{-1}	ND[x]	4.4 ± 0.7	4,962	*Bacillus safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
2	3.3×10^7 CFU g^{-1}	ND	3.6 ± 0.5	3,464	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
3	4.9×10^8 CFU g^{-1}	ND	0	-328	*Bacillus subtilis*	*B. subtilis*	*B. subtilis*
4	1.0×10^7 CFU g^{-1}	ND	3.4 ± 0.3	131	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
5	8.2×10^6 CFU g^{-1}	2.40	3.3 ± 0.3	3,549	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
6	2.0×10^7 CFU g^{-1}	ND	3.1 ± 0.3	1,251	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
7	1.0×10^9 CFU mL^{-1}	ND	2.5 ± 0.3	-166	*Bacillus licheniformis*	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*
8	1.8×10^7 CFU g^{-1}	ND	3.5 ± 0.4	1,697	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
9	2.3×10^9 CFU mL^{-1}	ND	0	365	*Bacillus amyloliquefaciens*	*B. subtilis*、*Bacillus siamensis*	*B. siamensis*
10	4.9×10^8 CFU mL^{-1}	ND	0	-563	*Bacillus subtillis*	*B. subtillis*	*B. subtillis*
11	7.4×10^8 CFU mL^{-1}	0.16	4.4 ± 0.6	-459	*B. subtilis*	*B. siamensis*	*B. siamensis*
12	5.4×10^6 CFU g^{-1}	ND	0	950	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*
13	5.7×10^6 CFU g^{-1}	1.80	0	1,107	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*
14	1.9×10^6 CFU g^{-1}	ND	3.3 ± 0.4	3,162	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*

[z] Effective plate count of phosphate solubilizing bacteria: plate count number for solid product more than 1×10^7 CFU g^{-1}, and plate count number for liquid product more than 1×10^8 CFU mL^{-1}. Acceptable deviation limit between registration record and market sampling of product: CFU without upper limit; however, the lowest acceptable limit of CFU was one tenth of the registration record as shown on Category and Specificity of Fertilizers. (revised on 2013/4/3)

[y] Contamination rate shall not exceed 15% and 5% for solid and liquid products, respectively.

[x] Species name based on rDNA sequence data when product was registered. The 16S rDNA sequence of target strain was identified by comparing with that of standard strain in the website of EzBioCloud. (2019/10/28)

[w] After purification, phosphate solubilizing bacteria were identified by 16S rDNA sequencing. The sequences of 16S rDNA were compared with those of standard strains in the website of EzBioCloud. (2019/10/28)

菌株菌種名稱皆為 *Bacillus safensis*，而上述 7 個產品登記時所提供的 16S rDNA 序列，在 EzBioCloud 網站中比對後的菌種名稱亦為 *B. safensis*。另外，從上述 7 個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱也是 *B. safensis*，由此可判定，上述 7 個市售產品目標菌株菌種名稱皆符合農糧署規定。產品編號 3 與 10 這 2 個產品，在產品上所標示的目標菌株菌種名稱皆為 *Bacillus subtilis*，而上述 2 個產品登記時所提供的 16S rDNA 序列，在 EzBioCloud 網站中比對後的菌種名稱亦為 *B. subtilis*。另外，從上述 2 個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱也是 *B. subtilis*。由此可判定，上述 2 個市售產品目標菌株菌種名稱皆符合農糧署規定。產品編號 7、12 與 13 這 3 個產品，在產品上所標示的目標菌株菌種名稱皆為 *Bacillus licheniformis*，而上述 3 個產品登記時所提供的 16S rDNA 序列，在 EzBioCloud 網站中比對後的菌種名稱亦為 *B. licheniformis*。另外，從上述 3 個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱，也是 *B. licheniformis*。由此可判定，上述 3 個市售產品目標菌株菌種名稱皆符合農糧署規定。產品編號 9 在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為 *Bacillus amyloliquefaciens*，但該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列與 EzBioCloud 網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為 *B. subtilis* 與 *Bacillus siamensis*。而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. siamensis*，因該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中比對後的微生物菌種名稱有 *B. siamensis*，判定產品編號 9 菌種名稱符合農糧署規定。產品編號 11 在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為 *B. subtilis*，但該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBio-Cloud 網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為 *B. siamensis*。而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. siamensis*，因該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中比對後的微生物菌種名稱為 *B. siamensis*，判定產品編號 11 菌種名稱符合農糧署規定。由上述結果可知，14 個溶磷菌肥料產品其溶磷菌目標菌株之菌種鑑定合格率為 100%。

目前國內在微生物肥料限制事項中只有大腸桿菌群的測定，尚無大腸桿菌與沙門氏菌之檢測。農業試驗所委託弘光科技大學食品與化妝品品質檢驗與分析中心檢測市售 14 個產品之大腸桿菌群、大腸桿菌與沙門氏菌，結果顯示，14 個溶磷菌肥料產品之大腸桿菌群皆符合農糧署肥料規定，其大腸桿菌群皆小於 1×10^3 菌落形成數，而大腸桿菌與沙門氏菌檢測結果皆呈現陰性。

由 2017 年各項檢測結果可知，農業試驗所由市面上購得的 14 個溶磷菌肥料產品只有 5 個皆符合農糧署肥料規格，合格率為 36%。

2018 年市售溶磷菌肥料產品品質分析

2018 年農業試驗所由市面上購得 16 個溶磷菌肥料產品，其溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環與溶磷酸鈣活性檢測及菌種鑑定結果，如表 3 所示。由檢驗結果 (表 3) 可知，產品編號 14 的溶磷菌有效活菌數，未達固態每公克 1×10^7 菌落形成數以上之規定，判定為不合格之產品，不合格率為 6%。產品編號 14 在產品登記時，所用的檢測方法為農糧署公告方法。

在雜菌率檢測方面，由檢驗結果 (表 3) 可知，16 個市售溶磷菌肥料產品中，產品編號 2 的雜菌率高達 52.9%，超過固態產品雜菌率 15% 之規定，依農糧署的規定判定為不合格之產品，不合格率為 6%。產品編號 2 在產品登記時，所用的檢測方法為農糧署公告方法。

在溶磷環檢測方面，由檢驗結果 (表 3) 可知，16 個市售溶磷菌肥料產品之溶磷環只有產品編號 8 與產品編號 11 超過 5 mm，而產品編號 3、7、9、10 及 12 產品之溶磷環為 0。

在溶磷菌活性檢測方面，由檢驗結果 (表 3) 可知，產品編號 9、10、11、12、16、17 的溶磷菌活性皆為負值，依農糧署的規定判定為不合格之產品，不合格率為 38%。產品編號 9、10、11，在產品登記時，檢測方法為經濟部標準檢驗局 CNS15301-3，其溶磷菌活性培養基配方中的磷酸鈣 [$Ca_3(PO_4)_2$] 為 0.3 g L^{-1}，而農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中

表 3. 2018 年市售溶磷菌肥料產品品質分析。

Table 3. Commercial product quality analysis of phosphate-solubilizing bacteria in 2018.

Sample no.	Plate count[z]	Contamination rate[y] (%)	Phosphate solubilizing halo zone (mm)	Tricalcium phosphate solubilizing activity [μg g^{-1} (mL^{-1}) day^{-1}]	Species name of target strain on product label	Species name based on rDNA sequence data when product was registered[x]	Species name of products bought from market in 2018 and identified by rDNA sequence[w]
1[z]	5.9×10^7CFU g^{-1}	ND[w]	4.3 ± 0.7	4,739	*Bacillus safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
2	1.6×10^7CFU g^{-1}	52.9	3.3 ± 1.7	627	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
3	1.5×10^8CFU g^{-1}	ND	0	422	*Bacillus subtilis*	*B. subtilis*	*B. subtilis*
4	4.8×10^7CFU g^{-1}	ND	3.0 ± 0.4	4,176	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
5	2.2×10^7CFU g^{-1}	0.9	3.4 ± 0.4	1,406	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
6	4.2×10^7CFU g^{-1}	ND	4.1 ± 0.8	287	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
7	1.7×10^9CFU mL^{-1}	ND	0	760	*Bacillus licheniformis*	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*
8	1.9×10^7CFU g^{-1}	0.5	5.9 ± 1.1	1,774	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
9	2.0×10^9CFU mL^{-1}	ND	0	-536	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Bacillus subtilis*、*Bacillus siamensis*	*Bacillus velezensis*
10	1.9×10^8CFU mL^{-1}	ND	0	-36	*Bacillus subtillis*	*B. subtillis*	*B. velezensis*
11	9.8×10^7CFU mL^{-1}	ND	5.5 ± 0.7	-296	*B. subtilis*	*B. siamensis*	*B. velezensis*
12	1.6×10^7CFU g^{-1}	ND	0	-1,932	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*	*B. licheniformis*
14	8.4×10^6CFU g^{-1}	ND	3.3 ± 0.4	408	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
15	8.6×10^7 CFU g^{-1}	0.1	4.4 ± 1.3	2,474	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
16	2.2×10^8CFU g^{-1}	ND	3.0 ± 0.4	-303	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*
17	2.6×10^7CFU g^{-1}	ND	4.5 ± 1.1	-2,977	*B. safensis*	*B. safensis*	*B. safensis*

[zyxw] Legends same as Table 2.

的磷酸鈣 [$Ca_3(PO_4)_2$] 為 5 g L^{-1}，其他培養基成分與用量皆相同。產品編號 12、16、17 在產品登記時，所用的檢測方法為農糧署公告方法。培養基配方中的磷酸鈣含量是否會影響溶磷菌活性，需要進一步探討。

在菌種鑑定方面，將 16 個溶磷菌肥料產品之目標溶磷菌菌株已組合的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中標準菌株的 16S rDNA 進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱 (如表 3)。另外，亦將廠商在產品上所標示的目標菌株菌種名稱，及產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中標準菌株的 16S rDNA 進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱列於表 3。由表 3 中可知，產品編號 9 在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為 *B. amyloliquefaciens*，但該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為 *B. subtilis* 與 *B. siamensis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *Bacillus velezensis*。因該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中比對後的微生物菌種名稱非 *B. velezensis*，判定產品編號 9 菌種名稱不符合農糧署規定。產品編號 10 在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為 B. subtilis，但該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱亦為 *B. subtilis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. velezensis*。因該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中比對後的微生物菌種名稱非 *B. velezensis*，判定產品編號 10 菌種名稱不符合農糧署規定。產品編號 11 在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為 *B. subtilis*，但該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為 *B. siamensis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. velezensis*。因該產品在登記時所提供的 16S rDNA 序列，與 EzBioCloud 網站中比對後的微生物菌種名稱非 *B. velezensis*，判定產品編號 11 菌種名稱不符合農糧署規定。由上述結果可知，不合格率為 19%。

由 2018 年各項檢測結果可知，農業試驗所由市面上購得的 16 個溶磷菌肥料產品，只有 8 個皆符合農糧署肥料規格，合格率為 50%。

討論

由 2017 年與 2018 年檢測結果可知，農業試驗所在市面上購得的 30 個市售溶磷菌肥料產品，只有 13 個皆符合農糧署溶磷菌肥料規格，兩年合格率平均為 43%。上述檢測結果，為國內微生物肥料產品上市以來第一次全面性的微生物肥料產品之品質分析。根據 Catroux *et al*. (2001) 所述，全世界商業生產的所有豆科植物接種劑中，有 90% 被認為對生產力沒有任何實際影響，這主要歸因於產品品質差。Herrmann & Lesueur (2013) 的研究指出，65 個微生物產品中，只有 37% 的產品是純的微生物菌劑，而其他 63% 被雜菌污染，且 40% 產品中沒有指標微生物。這些結果凸顯出微生物肥料產品需要更好的品質控制系統，以確保有效的產品能夠到達最終用戶。品質保證和品質控制的實施，不僅有助於微生物肥料產品在田間獲得更好和更一致的結果，而且還可以從市場上去除品質差的產品，進而提高農民的信心。品質保證是微生物肥料製造商在生產過程中，每個階段都必須達到設定的標準，才能進入下一個生產步驟，否則生產中止。品質控制則由獨立的實驗室在微生物肥料產品出售前，檢測其品質是否符合標準，藉以控制準備出售的微生物肥料產品 (Stephens & Rask 2000)。對於微生物肥料產品的品質控制，各國法規規定不一，目前對於根瘤菌接種劑以法國擁有最嚴格的標準：(1) 所有根瘤菌接種劑應證明對環境無害，(2) 根瘤菌接種劑應由純培養物製成和無菌載體，(3) 每粒種子在播種時其活菌數至少需 10^6 個活的細胞，(4) 從出廠到儲架期間皆需無污染，以及 (5) 產品每季使用前皆需經過獨立的實驗室檢定合格 (Herrmann & Lesueur 2013)。

從 2018 年起，農糧署及各縣市政府開始

進行微生物肥料產品抽樣，並送樣至農業試驗所進行檢驗，希望能在微生物肥料產品品質上進行控管。2018 年農糧署抽樣的樣品檢測項目，只有微生物肥料的活菌數，檢驗結果顯示：在 10 個抽樣產品中，有 3 個產品未達農糧署微生物肥料活菌數規格，不合格率為 30%。國內目前的微生物肥料產品無微生物肥料活性的定量指標之規定，且無需進行微生物肥料的肥 (功) 效試驗，這些微生物肥料產品是否可提高作物對營養元素之吸收，尚待進一步測試。目前國內農民使用微生物肥料的比率不高，主要是由於微生物肥料肥 (功) 效不穩定，而造成肥 (功) 效差的原因為微生物肥料產品菌體肥 (功) 效差或載體配方不合適。微生物肥料肥 (功) 效的提升，可藉由廠商或政府的田間 (或盆栽) 肥 (功) 效評估試驗來把關。

有關微生物肥料載體配方之研究，為了維持微生物肥料肥 (功) 效，載體配方應結合以下幾個特點：(1) 載體配方應為微生物提供保護環境 (例如：提供菌體養分，適宜的 pH 值及含水量等)，使微生物有最佳生長，並在儲存期間、運輸過程以及加入土壤後，防止其菌數減少。(2) 產品配方應該易於使用，對環境友善，並且具有成本效益，且製作材料易於取得 (Bashan 1998; Hungria *et al*. 2005)。有關微生物肥料載體配方之研究，尚待研發人員積極投入開發。

引用文獻

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnol. Adv. 16:729−770.

Brockwell, J. and P. J. Bottomley. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. Soil Biol. Biochem. 27:683−697.

Catroux, G., A. Hartmann, and C. Revellin. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant Soil 230:21−30.

Ghosh, T. K., R. P. Singh, J. S. Duhan, and D. S. Yadav. 2001. A review on quality control of biofertilizer in India. Fert. Mark. News 32:1−9.

Herrmann, L. and D. Lesueur. 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97:8859−8873.

Hungria, M., M. F. Loureiro, I. C. Mendes, R. J. Campo, and P. H. Graham. 2005. Inoculant preparation, production and application. p.223−253. *in*: Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. (Werner, D. and W. E. Newton, eds.) Springer. Dordrecht, Netherlands. 350 pp.

Kane, M. D., L. K. Poulsen, and D. A. Stahl. 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. Appl. Environ. Microbiol. 59:682−686.

Lin, C. and D. A. Stahl. 1995. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. Appl. Environ. Microbiol. 61:1348−1351.

Stephens, J. H. G. and H. M. Rask. 2000. Inoculant production and formulation. Field Crops Res. 65:249−258.

Quality Analysis of Commercial Phosphate-Solubilizing Bio-Fertilizer Products

Su-Chen Lin[1,*], Zi-Jun Lin[2], and Shiuan-Yuh Chien[3]

Abstract

Lin, S. C., Z. J. Lin, and S. Y. Chien. 2020. Quality analysis of commercial phosphate-solubilizing bio-fertilizer products. J. Taiwan Agric. Res. 69(1):90–100.

Only bio-fertilizers with good quality can assure their promotion in plant nutrients absorption and growth in the field, and the supervision of product quality from government side could play a key role not only in helping bio-fertilizers providing a better and consistent results in the field, but also in eliminating products with bad quality. Both efforts could enhance the farmers' confidence in these microbial products. In this report, all of the analysis results of commercial phosphate-solubilizing bio-fertilizers, purchased from markets from 2017 to 2018, were documented. The scope of product analysis included total plate count of viable microbes, contamination rate, phosphate-solubilizing halo zone, phosphate-solubilizing activity, and target species identification. All of methodologies followed the publications by Agriculture and Food Agency (AFA). In 2017, only 5 out of 14 commercial products (36%) met the requirements by AFA. In 2018, only 8 out of 16 commercial products (50%) met the requirements by AFA. This is the first product quality report about commercial phosphate-solubilizing bio-fertilizers in Taiwan. This results will be submitted to AFA and be contributed to the revision of the management regulations of bio-fertilizers in the future.

Key words: Bio-fertilizer, Phosphate-solubilizing bacteria, Quality supervision.

Received: June 4, 2019; Accepted: November 17, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: linmay@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Project Assistant, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Former Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):101–112 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0008 研究報告

花蓮縣光復鄉原鄉農民訓練需求評估研究

湯楊欽憲[1,*] 張淑君[2]

摘要

湯楊欽憲、張淑君。2020。花蓮縣光復鄉原鄉農民訓練需求評估研究。台灣農業研究 69(1):101–112。

本研究利用訓練需求評估的方法，以花蓮縣光復鄉原住民農民為對象進行本文研究。由於光復鄉是少數幾個以水稻栽培為主且面積較大的原住民鄉鎮，亦有全台唯一紅糯米具有產業規模的產業規模，據此藉以探討從事農業經營者的訓練發展需求。同時，就不同屬性經營者 (如作物類別、農民專兼業程度、年齡等) 進行研析，以呈現地區農業訓練需求的現況。研究於 2018 年 1–3 月在光復鄉地區進行問卷調查，並利用召開農民會議時進行發放，最後回收有效問卷 323 份，整體回收率 84%。研究工具為「農民訓練需求評估」問卷，以次分配、百分率、樣本平均數及標準差進行描述性統計；再以交叉分析瞭解兩個變數之間的關連性，又用卡方檢定兩種特性間相依或獨立，且做單因子變異數分析等。經分析調查資料後，獲得重要研究結論，包含：(1) 光復鄉地區從事農業受訪者中，性別以女性占 59.2% (184 人) 較多；年齡以 51–60 歲為主，占 26.0%；耕地面積以 1 ha 內占多數，為 64.3%，土地以自有土地為主，占 83.9%。本區以栽培水稻為主，占 40.2%，其次為果樹占 31.5%。水稻銷售以糧商含農會銷售體系較多，占 51.2%，果樹與蔬菜在自行銷售占有較高比例，分別為 43.9% 及 54.1%。(2) 訓練天數以農民專兼業程度愈高，傾向訓練時間較短 (3 d) 占 82.2%，最適當的訓練方式則以專業農民、兼業農民對於演講法有較高支持度，分占 54.5% 及 38.2%。另外，副業農民對於學徒訓練有較高支持度 (37.2%)。可看出專業程度越低，愈傾向學徒式訓練。(3) 男性受訪者相較於女性受訪者對於訓練時間、訓練天數及訓練方法等 3 項訓練方式，有更高程度的訓練發展需求。由本研究結果可知，受訪的原住民地區農業經營者對於農業技能，均呈現顯著的發展需求。再深入探究，亦可發現農業經營者會依據主要種植作物類別、專兼業程度等，呈現出不同的訓練方式需求。因此，未來進行訓練規劃時，應符合於地區產業項目進行課程設計。

關鍵詞：原住民、農民、訓練需求評估。

前言

長久以來台灣原住民族在這塊土地上受不同時期外來政權的統治，因而使台灣原住民族社會陷入結構性之改變，在台灣社會經濟發展歷程當中，原住民相對處於弱勢地位。特別是經濟上的發展劣勢，使大量原住民青壯人口被迫離開山林原鄉，到都市地區尋求工作與發展機會。後果是原住民部落的人口結構趨向兩極，年長者與年幼者留在部落，同時部落發展呈現停滯狀態 (Pao 2009)。另外，有研究指出部落居民大多不願意離鄉工作，然而原鄉就業機會相對少，原住民勞動力中有 4 成希望留在原鄉工作，有 3 成希望在原鄉鄰近鄉鎮工作。惟因原鄉交通不便、基礎建設不足、工商活動不活絡，工作機會明顯不足，依賴傳統農業維生的原住民家庭承受最大的經濟衝擊。然而，山地原住民族的家庭經濟狀況遠不及平地人家庭，尤其是農戶 (Chen & Huang 2007)。

投稿日期：2019 年 2 月 27 日；接受日期：2019 年 11 月 27 日。
* 通訊作者：tangyang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 國立中興大學生物產業管理研究所教授。台灣 台中市。

原鄉農民在農產業上的發展有許多障礙，如土地的使用權力問題及原住民保留地使用的限制問題，這些因素成為原住民部落農業發展的限制，嚴重限制了農民生計。再者，一般人甚少思考政府所擬定政策的缺陷，如作物栽培輔導並未針對區域性、行銷管道、市場需求等進行通盤考量 (Chin 2010)。

根據行政院原住民族委員會 2016 年度人口統計資料，約有 30% 的原住民居住於山地鄉，且有接近半數的原住民希望可以在家鄉就業。另外，居住在山地鄉原住民族以從事「農林漁牧業」的比率較高，占 16.04% (Council of Indigenous Peoples 2016)。據此顯示出，較為缺乏工作機會的原鄉地區，農產業具有相對優勢存在。農委會報告指出，農業主管機關僅以年度計畫方式提供願意或實際從事農業者農業專業訓練的機會，缺乏長期整體的農業人力評估與發展規劃。為確保原住民農民接受教育訓練的機會，以及有效利用有限的施政資源，應評估分析未來農業人力市場質與量的需求，統籌規劃與運用教育訓練資源。部落經濟發展被補助的大多偏重於硬體改造與設置，軟體養成較易受忽略，導致原住民部落居民無法有穩定經濟來源，迫使大量原住民青壯人口離開原鄉到城市尋求工作與發展機會。長期扮演勞力輸出的結果，使部落發展停滯、人口逐漸老化，原鄉農業衰弱難以維持 (Chang 2012)。

規劃訓練方式與教育訓練內容時，必須針對受訓組織的需求進行探討，才能符合組織的真正需求。教育訓練需求是對組織內人員做分析，最重要的是組織中誰需要訓練以及他們需要哪種訓練 (Huang 2008)。為了對訓練需求評估有明確的認識，有必要先對需求評估概念加以詳細說明：訓練需求評估是透過系統性的觀點，對於問題的研究利用不同的來源進行資料蒐集，以便對下一個階段作出決定或建議 (Rosset 1987)。Swist (2001) 表示，訓練需求評估分析主要是由員工工作能力進行分析，進而解決組織期望與員工實際工作績效間的缺口。Soltani & Liao (2010) 認為組織訓練課程應該符合組織目標，並且讓受訓人員明確的瞭解真正受訓的目的。組織成員接受高度符合工作的培訓課程會獲得更高的滿意度，也發現直接或間接的培訓對生產力產生有益的影響 (Sahinidis & Bouris 2007)。

目前國內有關原住民農產業研究，大多以較廣泛層面的構想勾勒出農產業的問題，以農民技能訓練需求評估為基準點的研究較為缺乏。目前以原住民農業需求評估方面的研究，有「桃園區山地鄉農業推廣教育需求之初步研究、山地農民教育需求之研究」，這兩個研究僅針對農民在農業發展上的需求進行探討。本研究為使農民需求能突顯對部落農民組織的需求，特進行更詳細及準確的評估，檢視農民在農產業工作流程實際的需求為何。綜合上述之研究背景，本研究以「訓練需求評估」的方法，針對原鄉農民訓練需求情形進行分析評估加以探討，研析訓練發展人力培訓策略建議。

材料與方法

本研究透過需求評估-工作分析法，針對農民以及產銷組織進一步歸納出地區主栽培作物所需 knowledge, skill, ability and others (KSAO) 為何，工作分析的目的在於：(1) 瞭解某一工作的詳細內容；(2) 瞭解達成工作應有的知識、技能與態度，以工作進行分析一個多層次、多種類適應面廣泛的管理技術。依據學者 Steadham (1980) 所做的文獻與以往理論探討中可得知，有許多工作分析方法可以使用，例如觀察法、面談法、問卷法、工作日誌法、實驗法、計量分析法、典型事例法與工作實踐法等。這些方法都有各自的優缺點和主要適用對象及範圍，如果把兩種或兩種以上方法綜合使用，優勢互補，適用層面就可以非常廣泛 (Chang *et al*. 2005)。本研究在進行工作分析的方法上，是採用問卷法以獲得工作信息。透過工作分析進行各職位工作內涵，與釐清職權、職掌內容與責任範圍，Dessler (2000) 提出工作分析資料用途如圖 1 所示。

問卷設計

本研究根據工作分析所得問卷題項設計，主要以農業委員會委託中國生產力中心制訂「2007 年蔬菜產業職能標準」與「2015 年度農民學院標準化課程規劃成果」。另外，參考

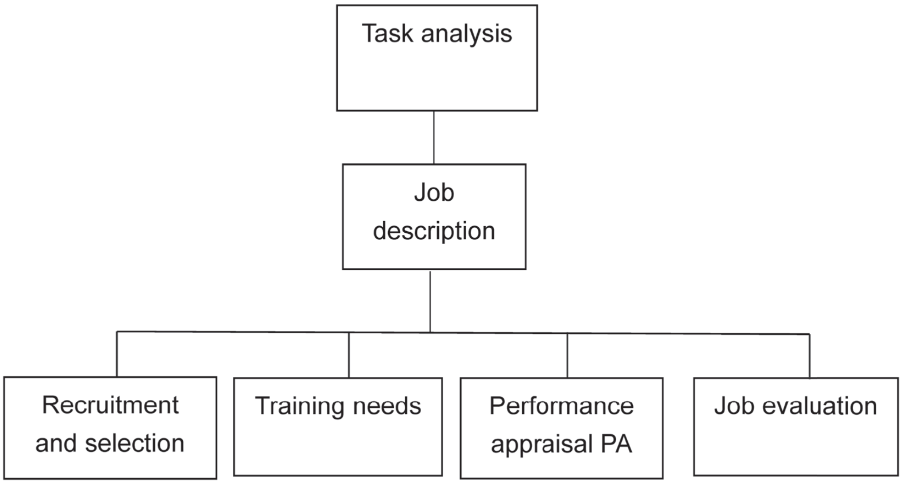


圖 1. 工作分析應用。
Fig. 1. Job analysis application.

有關農民職能與訓練需求之研究及 Chen & Huang (2007) 有關農漁民第二專長訓練成效評估，Chen (1992) 企業人力資源管理實務手冊，Yueh *et al*. (2009) 關於農民電腦網路技能訓練滿意度影響因素之研究，以及 Lay *et al*. (2014) 進行農民學院有機蔬菜初階班訓練成效追蹤評核研究的成果。問卷包括 5 大部分，第 1 部分是個人背景資料，共計 13 題；第 2 部分為農業知識，共計 15 題；第 3 部分有關農業技能，共計 15 題；第 4 部分為農業訓練內容需求，共計 13 題；第 5 部分為農業訓練方式需求，共計 4 題，問卷題項總計 60 題。本研究之問卷參考各專家研究之問項，並進行第一次修改，以及該問卷在施測前給予農業專家進行題項審閱，將理解上有問題或作答可能造成誤差之題目進行檢討和進行第二次修正，以完成調查問卷之編製。因此，整體上本研究之問卷具備專家效度，本研究採用結構式問卷為瞭解原鄉農民訓練需求之調查。

本研究參考國內訓練需求評估相關文獻繪製研究架構如圖 2 (Kuo & Kao 2006; Huang 2008)。

研究對象與調查步驟

本研究於 2018 年 1 月 3 日 –2018 年 3 月 13 日間於花蓮縣光復鄉地區發放問卷，共計 70 d，以花蓮縣光復鄉地區從事農業經營人員作為問卷調查的對象。鑒於目標對象族群範疇難以界定，以能提升問卷回覆的正確與準確程度，取得鄉公所與農會推廣人員的同意與協助。另外，在目標受訪對象取樣上，與受訪推廣人員的溝通協助獲得共識，鎖定具問卷填寫能力並願意參與問卷調查之農業經營者。抽樣樣本數經公式計算，若在 95% 信心水準下以及誤差在 5% 內，推估需要至少 384 份問卷。

資料分析方法

將調查問卷回收，剔除填答不完整者，將針對有效問卷進行整理後編號、輸入電腦建立檔案。隨後再使用 SPSS 22.0 中文版套裝統計軟體，進行資料的分析，分別以描述性統計、效度分析、交叉分析等方式進行統計分析。

描述性統計分析 (descriptive statistics analysis)

主要是針對個人及產業調查基本資料，進行樣本分布之次數分配、百分率、樣本平均數與標準差，描述樣本組成結構與各樣本之分布情形，可用於瞭解受訪者基本資料特性分布狀況。

交叉分析 (cross analysis)

這是一個基本的分析方法，在資料整理中，用統計方法來瞭解兩個變數之間的關聯性。欲研究此類之問題，我們必須將收集到之

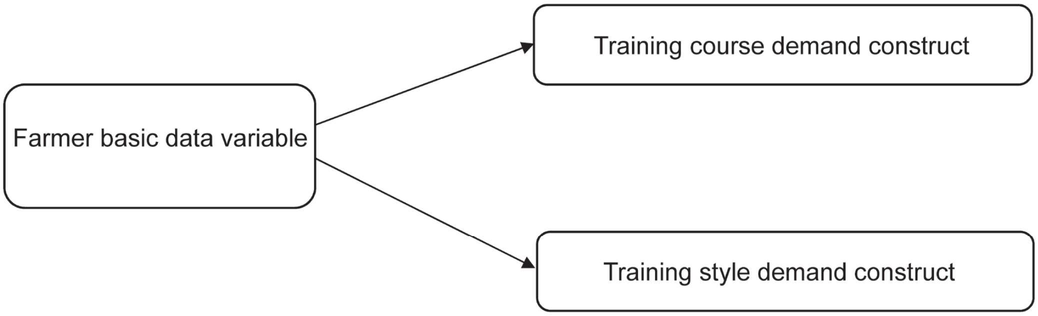


圖 2. 研究架構圖。
Fig. 2. Research architecture diagram.

資料區分成兩個變數之資料，然後再以列聯表 (contingency table) 或稱交叉表/交叉分類表來呈現。用來研究 2 種特性間相依或獨立，並且採用卡方統計量來進行檢定。

單因子變異數分析 (analysis of variance; ANOVA)

用於比較多組間的平均數差異，依變異來源分割為數個部分量測，這些不同變異來源若有差異，則進行事後比較確認各組差異情形。

研究流程

首先，將從相關文獻探討中建立研究模式及進行相關研究工具的設計與發展，本研究探討的問題藉由所蒐集到的資料進行統計分析以完成研究目的，有關研究流程可描繪如圖 3。

結果

背景分析

性別

光復鄉地區從事農業受訪者性別分析如 311 個樣本數，其中女性占 59.2% 為最多，男性則占 40.8%。推論可能與本地區為原住民阿美族群母系社會有關，進而影響女性在從事農業經營比例高於男性。

年齡

光復鄉地區從事農業受訪者年齡分析，以 51–60 歲為最多，其 311 個樣本數中占 26%；其次為 41–50 歲，占 20.6%；年齡在 31–40 歲與 61–70 歲分別占 17.7% 和 18.6%；整體受訪者的年齡分布大多集中於 31–70 歲之間。

農場經營面積

光復鄉地區從事農業受訪者在農場經營面積分析，如表 1。以 1 ha 以內最多，311 個樣本數中占 64.3%；1–10 ha 面積，占 31.2%；10 ha 以上耕作面積，僅占 1%。另外土地自有或承租比例進行分析以自有土地為主，占 83.9%；承租土地則僅占 11.6% (表 1)。

主要種植作物

光復鄉地區從事農業受訪者主要種植作物分析，如表 2。其中，以水稻為主，311 個樣本數中占 40.2%；其次為果樹作物，占 31.5%；第三的蔬菜部分僅占 19.6%，由此得知本區域以種植水稻、果樹為主 (表 2)。

主要種植作物與主要銷售方式交叉分析，係針對不同種植作物銷售方式進行交叉分析結果呈現顯著，如表 3 所示。主要種植作物為果樹受訪者自行銷售較高占 43.9%，合作社共同運銷次之占 30.6%；種植蔬菜受訪者自行銷售比例較高占 54.1%，合作社共同運銷占 26.2%；水稻則以糧商含農會銷售體系占有較高比例 51.2%，自行銷售占 28.9%。由以上可得知，不同作物所著重的銷售方式有不同，整體看來農民對於利用自行銷售比例高達 41.0%。其主要原因還是可獲得較高利潤，未來在課程安排上可考量關於自行銷售方面的課程納入考量，並且該課程占比可提高 (表 3)。

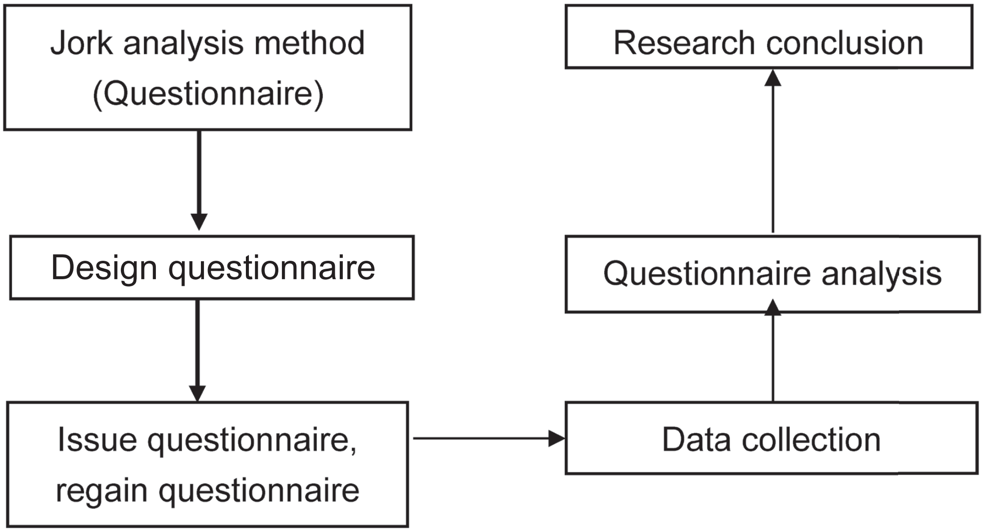


圖 3. 研究流程圖。
Fig. 3. Study process.

表 1. 農場經營面積分析。
Table 1. The analysis of farm management area.

Farm management area	Frequency	%
Effective		
Less than one hectare	200	64.3
1–10 hectares	97	31.2
Over 10 hectares	3	1.0
Total	300	96.5
Missing		
System	11	3.5
Total	311	100.0

專兼業程度

就不同專兼業程度進行敘述性描述前，先針對專兼業程度進行定義，專業農民 (農業經營所得占個人總收入高於 90%)、兼業農民 (農業經營收入介於 50–90% 的個人總收入)、副業農民 (農業所得並非個人的主要收入來源，占個人收入低於 50%)。光復鄉地區農民專兼業分布程度，以副業農民為主占 37.3%，其次為專業農民占 33.3%，再者為兼業農民占 29.4%。由上述分析，可瞭解花蓮縣光復鄉地區農民於專兼業程度分布之情形。

表 2. 光復鄉主要種植作物。
Table 2. Main cultivated crop by Guangfu Township.

Main cultivated crop	Frequency	%
Fruit	98	31.5
Vegetable	61	19.6
Rice	125	40.2
Mixed grain	4	1.3
Other	23	7.4
Total	311	100.0

實證分析

專兼業程度與最適當的訓練時間交叉分析

將最適當的訓練時間與農民專兼業程度分為專業農民、兼業農民、副業農民受訪經營者進行交叉分析，結果呈顯著相關如表 4。在 101 個專業農民中，有 59.4% 認為最適當的訓練時間為假日；在 89 個兼業農民中，則僅 41.6% 認為最適當的訓練時間為假日，另外有 46% 認為最適當的訓練時間為晚上；在 110 個副業農民中，有 62.7% 認為最適當的訓練時間為假日。不同專兼業程度對教育訓練方式需求顯著不同，將近 60% 的專業農民認為最適當的訓練時間為假日，兼業農民意見分散於

表 3. 光復鄉地區主要種植作物與主要銷售方式交叉分析。

Table 3. The main cultivated crop and sales method cross analysis of Guangfu Township.

Main cultivated crop	Farmers' association co-operative marketing	Farmers' cooperation co-operative marketing	Merchandiser	Self-sale	Other	Total
Fruit	15 15.3%	30 30.6%	4 4.1%	43 43.9%	6 6.1%	89 100%
Vegetable	4 6.6%	16 26.2%	0 0.0%	33 54.1%	8 13.1%	61 100%
Rice	62 51.2%	0 0.0%	0 0.0%	35 28.9%	24 19.8%	121 100%
Mixed grain	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	4 100.0%	0 0.0%	4 100%
Other	8 34.8%	4 17.4%	0 0.0%	11 47.8%	0 0.0%	23 100%
Total	89 29.0%	50 16.3%	4 1.3%	126 41.0%	38 12.4%	307 100%

晚上與假日，副業農民則有超過 60% 認為最適當的訓練時間為假日。此結果達到顯著，與 Huang (2008) 研究結果不相同，其研究結果為基本資料變項資料不同，對訓練方式需求顯著相同 (表 4)。

農民專兼業程度與最適當的訓練天數交叉分析

將最適當的訓練天數與專兼業程度進行交叉分析，結果呈顯著相關如表 5。在 101 個專業農民中，有 82.2% 認為最適當的訓練天數為 3 d；在 89 個兼業農民中，有 79.8% 認為最適當的訓練天數為 3 d；在 113 個副業農民中，有 61.9% 認為最適當的訓練天數為 3 d。此結果達到無差異顯著，不同專兼業程度農民對教育訓練方式需求無差異顯著，但依據表格內容可看出專兼業程度愈高，愈傾向最適當的訓練天數為 3 d (表 5)。

年齡與最適當的訓練月分交叉分析

將最適當的訓練月分與年齡進行交叉分析，結果如表 6。從各年齡層來看，21–30 歲的 23 個樣本中，有 56.5% 認為最適當的訓練月分為 1–3 月；31–40 歲的 55 個樣本中，有 34.5% 認為最適當的訓練月分為 4–6 月；41–50 歲的 64 個樣本中，有 45.3% 認為最適當的訓練月分為 4–6 月；51–60 歲的 81 個樣本中，有 49.4% 認為最適當的訓練月分為 4–6 月；61–70 歲的 58 個樣本中，有 34.5% 認為最適當的訓練月分為 4–6 月；71–80 歲的 22 個樣本中，有 36.4% 認為最適當的訓練月分為 1–3 月；81–90 歲的 8 個樣本中，有 50.0% 認為最適當的訓練月分為 4–6 月，有 50.0% 認為最適當的訓練月分為 10–12 月。此結果沒有達到顯著，與 Huang (2008) 研究結果相同，不同年齡層對教育訓練方式需求無顯著不同，但可看出 21–30 歲與 71–80 歲傾向認為最適當的訓練月分為 1–3 月，81–90 歲意見分散於 4–6 月及 10–12 月，31–70 歲則皆傾向認為最適當的訓練月分為 4–6 月 (表 6)。

專兼業程度與最適當訓練方法交叉分析

針對不同專兼業程度與最適當的訓練方法進行交叉分析，由表 7 可得下列結果。專業農民選擇以演講法占多數 54.5%，其次為個案研究法占 33.7%；兼業農民以演講法居多占 38.2%，其次為學徒式訓練 29.2%。副業農民則以學徒式訓練占多數為 37.2%，其次為演講法 23.9%，就整體專兼業程度而言，最適當訓練方法以演講法為主 38.3%，另外個案研究與學徒式訓練各占 23.1% 及 20.8%。未來課程規劃可採用混合課程設計，採用演講法為主另外搭配個案研究或學徒式訓練加強學習成效 (表 7)。

表 4. 專兼業程度與訓練時間交叉分析。

Table 4. Professional level and training time cross analysis.

	Training time			
Professional level	Day	Night	Holiday	Total
Professional farmer				
Frequency	15	26	60	101
Percentage	14.9%	25.7%	59.4%	100%
Part-time farmer				
Frequency	11	41	37	89
Percentage	12.4%	46.1%	41.6%	100%
Sideline farmer				
Frequency	18	23	69	110
Percentage	16.4%	20.9%	62.7%	100%
Total				
Frequency	44	90	166	300
Percentage	14.7%	30.0%	55.3%	100%

表 5. 專兼業程度與訓練天數交叉分析。

Table 5. Professional level and training days cross analysis.

	Training days			
Professional level	3 d	5 d	7 d	Total
Professional farmer				
Frequency	83	4	14	101
Percentage	82.2%	4.0%	13.9%	100%
Part-time farmer				
Frequency	71	11	7	89
Percentage	79.8%	12.4%	7.9%	100%
Sideline farmer				
Frequency	70	25	18	113
Percentage	61.9%	22.1%	15.9%	100%
Total				
Frequency	224	40	39	303
Percentage	73.9%	13.2%	12.9%	100%

光復鄉地區性別對與訓練方式之差異檢定分析

在此為瞭解不同性別對於訓練方式需求之差異情形，受訪者為男、女兩個群組，同時運用獨立樣本 t 檢定，針對於訓練方式需求進行分析。依據表 8 所得結果顯示，有 3 個訓練方式需求，呈現出統計上顯著差異情形。

訓練方式需求中包括「訓練時間」($P = 0.002 < 0.01$)、「訓練天數」($P = 0.000 < 0.01$)、「訓練方法」($P = 0.027 < 0.05$) 等 3 類項目的訓練方式需求。對於男女兩類群組，從其需求 t 檢定分析結果可知，彼此間呈現出顯著差異之情形。再依訓練方式需求平均數高低進行判斷，可發現男性受訪者，相較於女性受訪者對

表 **6.** 年齡與訓練月分交叉分析。

Table 6. Age and training month cross analysis.

Age	Training time				Total
	Jan.–March	April–Jun.	July–Sept.	Oct.–Dec.	
21–30					
Frequency	11	6	3	3	23
Percentage	47.8%	26.1%	13.0%	13.0%	100%
31–40					
Frequency	17	19	7	12	55
Percentage	30.9%	34.5%	12.7%	21.8%	100%
41–50					
Frequency	17	29	8	10	64
Percentage	26.6%	45.3%	12.5%	15.6%	100%
51–60					
Frequency	19	40	7	12	81
Percentage	23.5%	49.4%	8.6%	14.8%	100%
61–70					
Frequency	15	20	7	16	58
Percentage	25.9%	34.5%	12.1%	27.6%	100%
71–80					
Frequency	8	6	4	4	22
Percentage	36.4%	27.3%	18.2%	18.2%	100%
81–90					
Frequency	0	4	0	4	8
Percentage	0.0%	50.0%	0.0%	50.0%	100%
Total					
Frequency	87	124	36	61	311
Percentage	28.0%	39.9%	11.6%	19.6%	100%

表 **7.** 專兼業程度與訓練方法交叉分析。

Table 7. Professional level and training method cross analysis.

Professional level	Trining method					Total
	Speech	Group discussion	Apprenticeship	Case study	E-learning	
Professional farmer						
Frequency	55	12	0	34	0	101
Percentage	54.5%	11.9%	0.0%	33.7%	0.0%	100%
Part time farmer						
Frequency	34	18	26	11	0	89
Percentage	38.2%	20.2%	29.2%	12.4%	0.0%	100%
Sideline farmer						
Frequency	27	18	37	25	6	113
Percentage	23.9%	15.9%	37.2%	22.1%	5.3%	100%
Total						
Frequency	116	48	63	70	6	303
Percentage	38.3%	15.8%	20.8%	23.1%	2.0%	100%

於訓練時間、訓練天數、訓練方法等 3 項訓練方式需求有更高程度的訓練發展需求。

不同專兼業程度與課程訓練需求的差異比較

不同專兼業程度受訪者在職能項目訓練需求探討上，係將受訪者依其專兼業程度，區分為專業農民、兼業農民、副業農民等3個族群。再藉由單因子變異數分析，對其職能項目訓練需求進行差異檢定分析，所得結果如表 9 所示。

從表 9 所得結果發現，不同專兼業程度受訪者，對於職能項目訓練需求中有 3 項課程呈現出統計上的顯著差異，其餘 10 項課程訓練需求則未呈現出統計上的顯著差異。在「風土適應性評估、農業倫理」職能項目訓練需求上，對不同專兼業程度的受訪者，從其訓練需求分析結果可知，彼此呈現出具統計上顯著差異。顯示專業農民、兼業農民、副業農民受訪經營者，對於風土適應性評估、農業倫理項目的訓練需求確實存在明顯的差異情形；再經由 Scheffe 法的事後多重比較後發現，專兼業程度中以「副業農民」受訪者較於專業農民、兼業農民，對於「風土適應性評估、農業倫理」職能項目，擁有更強烈的訓練需求。

另外，在「經營策略」職能項目訓練需求上專兼業程度中，則以「專業農民」受訪者較兼業農民、副業農民有更顯著的訓練需求。由此可知，不同專兼業程度受訪者，對於職能項目課程，還是有不同程度需求。此外，在其餘

表 8. 性別與訓練方式獨立樣本 *t* 檢定。

Table 8. Gender and training method independent-sample *t* test.

Training method needs	Gender			
	Male	Female	*t*-value[z]	Significance
Training time	2.4016	2.3923	0.114*	0.002
Training days	1.5669	1.2500	3.772*	0.000
Training month	2.2047	2.5707	-1.439	0.195
Training method	2.3543	2.3261	0.193*	0.027

[z] *P-value < 0.05.

表 9. 專兼副業程度與課程訓練需求的單因子變異數分析。

Table 9. Professional level and course training needs one-way analysis of variance.

Competency dimension	Professional farmer	Part-time farmer	Sideline farmer	*F*-value	Significance	Post-hoc test
Environmental assessment course	1.3168	1.4157	1.2035	5.505	0.004	3 > 2
Variety assessment course	1.3069	1.3146	1.1593	4.363	0.140	
Cultivation management course	1.1584	1.2584	1.1770	1.692	0.186	
Disease and insect control course	1.0990	1.1236	1.0973	0.215	0.807	
Fertilizer management course	1.2376	1.1461	1.5929	4.187	0.160	
Harvest management course	1.1584	1.2697	1.2035	1.792	0.168	
Business strategy course	1.2178	1.4494	1.2832	6.442	0.002	2 > 1
Agricultural ethics course	1.3762	1.5169	1.2655	6.943	0.001	3 > 2
Quality management course	1.2673	1.4270	1.2655	3.825	0.023	
Marketing management course	1.2178	1.2247	1.2124	0.022	0.978	
Human resources course	1.4257	1.4831	1.3805	1.069	0.345	
Financial management course	1.3663	1.4944	1.3805	1.917	0.149	
Agricultural machinery course	1.2475	1.2135	1.1150	3.371	0.036	

職能項目課程訓練需求，在統計上看出有些許差異但未達顯著之水準。

討論

本研究探討以鄉、鎮等區域為主的原鄉農民訓練需求評估，利用問卷為調查工具，透過農民填寫問卷獲得資料後進行分析後，研擬出訓練發展方針。問卷發放作業由鄉公所、農會等推廣人員協助，包括問卷發放與行資料蒐集，並當場回收問卷，以確保問卷回收率。本研究發放 385 份，回收 323 份，其中汰除無效問卷 12 份，並進一步歸結數項結論如下。

背景分析

光復鄉地區從事農業受訪者中，性別方面，311 個樣本中以女性占 59.2% (184 人) 最多，男性則占 40.8% (127 人)；再者年齡方面，光復鄉地區農民以 51–60 歲為主占 26.0%，其次為 41–50 歲占 20.6%，整體受訪者年齡大多集中於 31–70 歲。光復鄉地區從事農業經營者耕地面積，以 1 ha 內占多數為 64.3%。另外，針對土地自有或承租比例進行分析結果，以自有土地為主占 83.9%。將光復鄉地區主要種植作物進行敘述性分析結果得知，本區以水稻栽培為主占 40.2%，其次為果樹占 31.5%，未來在本區培訓課程選擇應以這兩種作物為主。由分析結果可得知，光復鄉地區栽培水稻銷售以糧商含農會體系為主占 51.2%；果樹與蔬菜在自行銷售占有較高比例，分別為 43.9% 及 54.1%。又光復地區以栽培水稻占多數，在本區亦有完整產業鏈，所以栽培水稻農民會賣給地區糧商或農會系統。此外，有部分農民選擇自行銷售方式進行販售，就整體而言光復鄉地區自行銷售占有很高的比例為 41.0%，倘若未來規劃本區銷售課程可以就果樹與蔬菜品項為優先考量。

實證分析

不同專兼業程度對教育訓練方式需求顯著不同，可看出專兼業程度愈高，愈傾向認為最適當的訓練天數為 3 d。不同年齡層對教育訓練方式需求無顯著不同，但可看出 21–30 歲與 71–80 歲傾向認為最適當的訓練月分為 1–3 月，81–90 歲意見分散於 4–6 月及 10–12 月，31–70 歲則皆傾向認為最適當的訓練月分為 4–6 月。

最適當的訓練方式，以農民專兼業程度分析結果呈現，專業、兼業農民對於演講法有較高支持度占 54.5% 及 38.2%。另外，副業農民則以學徒式訓練占有較高支持度為 37.2%。可看出專兼業程度愈低，愈傾向學徒式訓練。未來課程規劃設計可依據課程內容採取混合式課程設計，專業農民可採用演講法或個案研究的方式進行訓練；兼業農民、副業農民利用演講法與學徒式訓練等方式提升訓練成效。

由光復鄉地區性別與訓練方式之差異檢定分析結果得知，男性受訪者對於訓練方式需求程度相較於女性有較高的訓練發展需求。將不同專兼程度農民與 13 項職能項目訓練課程進行單因子變異數分析，結果為專兼業程度之農民以「副業農民」受訪者較於專業農民、兼業農民，對於「風土適應性評估、農業倫理」職能項目，擁有更強烈的訓練需求；在「經營策略」職能項目訓練需求上專兼業程度中則以「專業農民」受訪者較兼業農民、副業農民有更顯著的訓練需求。

建議

綜合研究所得在此提出相關建議，以供未來進行花蓮縣光復鄉地區農民訓練發展規劃之參考：

一、依本研究結果得知受訪者對於 13 項職能訓練課程，均呈現需求。惟再深入探討亦可發現，風土適應性評估、農業倫理與經營策略等訓練項目，需求程度顯著大於其他訓練程。因此，未來在本區辦理相關專業訓練時，應可再縮小課程範圍，以這 3 項訓練課程為基礎進行課程設計；其中，光復鄉地區課程進行方式以演講、個案討論、學徒式訓練 (實作) 為主，課程進行避免選擇單一方式進行，以混合搭配為優先以提升訓練效益。

二、在課程天數農民能接受最長天數以 3 d 內為主，避免安排過度冗長天數會直接對於

接受訓練意願造成影響；再者為避免農忙時間安排訓練課程其中，以 31–70 歲農民受訪者資料顯示光復地區適合接受訓練時間為 4–6 月分為優先。是以農民訓練課程內容與方式如能更貼近受訓者的需求，就能產出較大的訓練效益。

三、光復鄉地區以阿美族為主，阿美族的社會組織以母系相傳，阿美族男子入贅女方家後需協助妻子的工作，靠勞動換取夫妻生活，男人並無實權只是協助女方處理事務。這點也經由分析中顯現，在光復鄉地區性別與訓練方式差異檢定結果為，男性受訪者相較於女性受訪者對於訓練方式需求高於女性受訪者。綜合上述，未來光復鄉地區訓練對象可以將男性列為主要受訓對象。

引用文獻

Chang, S. C., M. S. Lee, and S. M. Shih. 2005. The investigation for training & education demands from the logistic professional department: Taking the P company for example. J. Hum. Resour. Manage. 5(4):67–105. (in Chines with English abstract)

Chang, W. C. 2012. Indigenous people become the reflection of the organic professional farming process: Knowledge food sovereignty and physical discipline. Taiwan Indi. Stud. Rev. 12:245–289. (in Chinese)

Chen, M. H. 1992. Enterprise Human Resource Management Practice Manual. Chinese Business Management and Skill Development Center. Taipei, Taiwan. 814 pp. (in Chinese)

Chen, H. M. and W. S. Huang. 2007. Economic Status Survey of Indigenous Peoples, 2006. Council of Indigenous People. Taipei. 137 pp. (in Chinese)

Chin, C. H. 2010. The rural regeneration plan in indigenous tribe: A case study of pinaski. Master Thesis, Graduate Institute of Policy and Development, Nation Taitung University. Taitung, Taiwan. 130 pp. (in Chines with English abstract)

Council of Indigenous Peoples. 2016. The Third Employment Status Survey of Indigenous Peoples, 2016. Council of Indigenous People. Taipei. 374 pp. (in Chinese)

Dessler, G. 2000. Human Resource Management. 8th ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 699 pp.

Huang, C. C. 2008. A rearch on the employee training rquirement of tavel agency in Kinmen. J. Leisure Recreat. Ind. Manag. 1(2):28–42. (in Chines with English abstract)

Kuo, S. C. and Y. H. Kao. 2006. Teaching effectiveness and in-service education needs for clinical nursing teachers in technological and vocational schools. J. Evid. Based Nurs. 2:273–283. (in Chinese with English abstract)

Lay, S. J., K. S. Chung, T. H. Lee, and Z. L. Fu. 2014. Evaluation research on the effect of basic organic vegetable cultivation training program of farmer's academy. Bull. Taoyuan DARES 76:57–91. (in Chinese with English abstract)

Pao, C. H. 2009. The plight and strategy of indigenous community tourism development: A case study of King Young and Utaes communities. Taiwan J. Indig. Stud. 2(4):87–109. (in Chines with English abstract)

Rosset, A. 1987. Training Needs Assessment. Educational Technology Publications. Englewood Cliffs, NJ. 294 pp.

Sahinidis, A. G. and J. Bouris. 2008. Employee perceived training effectiveness relationship to employee attitudes. J. Eur. Ind. Train. 32:63–76.

Soltani, E. and Y. Y. Liao. 2010. Training interventions: Fulfilling managerial ends or proliferating invaluable means for employees. Eur. Bus. Rev. 22:128–152.

Steadham, S. V. 1980. Learning to select a needs assessment strategy. Train. Dev. J. 30:55–61.

Swist, J. 2001. Conducting a training needs assessment. http://www.amxi.com/amx_mi30.htm.pdf (vist on 09/01/2019)

Yueh, H. P., T. L. Chen, and L. A. Chiu. 2009. Exploring factors affecting farmer's satisfaction with information and communication technology training. J. Agri. Assoc. Taiwan 10:470–489. (in Chinese with English abstract)

Assessment Study on Indigenous Farmers Training Needs at Guangfu Township in Hualien County

Cin-Sian Tang Yang[1,*] and Shu-Chun Chang[2]

Abstract

Tang Yang, C. S. and S. C. Chang. 2020. Assessment study on indigenous farmers training needs at Guangfu township in Hualien county. J. Taiwan Agric. Res. 69(1):101–112.

This study adopted the training needs assessment method to study the training and development needs for agricultural operators at Guangfu Township in Hualien County. The different attribute of operators, such as crop categories, special experiences and ages, are analyzed to present regional agricultural characteristics. A questionnaire survey regarding the current situation of training needs was conducted at Guangfu Township from January to March in 2018, and was distributed during the farmers' meeting. A total of 323 valid questionnaires were collected with the overall recovery rate of 84%. Research tool "Farmer Training Needs Assessment" questionnaire was applied, including descriptive statistics for sub-allocation, percentage, sample mean and standard deviation. By using cross-analysis, the correlation between 2 variables was evaluated. The Chi-Square test was used to determine the dependence or independence of the 2 characteristics. The summaries from data analyses include: (1) About 83.9% of area is cultivated land, of which 64.3% of farmers had 1 ha of cultivated land at Guangfu Township. 40.2% is mainly rice cultivation, followed by fruit trees accounting for 31.5%. The farmer's joint marketing and sales accounted for 51.2%; the fruit trees accounted for a high proportion of 43.9%. (2) The most appropriate training method for the first-time interviews in the Guangfu Township area is that the speech method has a high degree of support of 38.3%, the case study is 23.1%, and the apprenticeship training is 20.8%. The future curriculum planning can be based on the course. The content adopts a mixed curriculum design, which uses teaching and implementation methods to improve training effectiveness. According to the results of this study, the agricultural operators surveyed in the aboriginal areas showed significant development needs for agricultural skills. In-depth exploration found that agricultural operators presented different training methods according to the main types of crops, the degree of professionalism, and the training methods. It should be designed in accordance with regional industrial projects.

Key words: Indigenous, Farmers, Training needs assessment.

Received: February 27, 2019; Accepted: November 27, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: tangyang@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Professor, Department of Bio-Industry Management, National Chung Hsing University, Taichung Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editor

Yang, Ming-Der
Department of Civil Engineering, National Chung Hsing University

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultant to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute
Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 69 No. 1 March 31, 2020

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture
Publisher Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief Chwen-Ming Yang
Address No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission http://www.ipress.tw/J0042

Press Ainosco Press
Address 18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel +886-2-2926-6006
E-mail press@airiti.com

Price NT$ 175 (per copy)
Distributor
1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC
   GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207
2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC
   Tel: +886-4-2226-0330